



Mariana Vivas Elpídio Ruas de Pinho

Licenciada em Engenharia Alimentar

Aplicação de biofilmes de quitosano e de atmosfera modificada na conservação de pêra Rocha de 4ª Gama

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e
Segurança Alimentar na área de especialização de
Qualidade Alimentar

Orientador: Professor Doutor Fernando José Cebola Lidon
da Faculdade de Ciências e Tecnologia
Co-orientadora: Doutora Claudia Sánchez Lara
do Instituto Nacional de Investigação Agrária

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguentes: Prof. Doutor Nuno Bartolomeu Mendes Godinho de Alvarenga

Prof. Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo

Vogais: Professor Doutor Fernando José Cebola Lidon

Doutora Claudia Verónica Sánchez Lara



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011



Mariana Vivas Elpídio Ruas de Pinho

**Aplicação de biofilmes de quitosano e de
atmosfera modificada na conservação de
pêra Rocha de 4^a Gama**



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

2011



Aplicação de biofilmes de quitosano e de atmosfera modificada na conservação de pêra 'Rocha' de 4ª Gama

Copyright

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências e Tecnologia. Ao Instituto Nacional de Recursos Biológicos, especificamente ao INIA (Instituto Nacional de Investigação Agrária), Departamento de Fisiologia Vegetal, onde o trabalho se realizou e que contou, em parte, com o apoio financeiro da EU, através do projecto de IED Theoretical Developments and Empirical Measurement of External Costs of Pesticides (TEAMPEST).

À *Campotec*, empresa de processamento de hortofrutícolas, líder de mercado, que amavelmente nos permitiu realizar ensaios de atmosfera modificada nas suas instalações. Ao Eng.º Délio Dias Raimundo da *Campotec*, pelas horas intermináveis de trabalho conjunto, pela simpatia, pela amizade e pela prontidão sempre prestados para qualquer dúvida, esclarecimento ou ajuda.

À Estação Fruteira *Frutus*, por ter gentilmente cedido as peras utilizadas nos ensaios desta dissertação.

Ao Professor Fernando Lidon, pelo quanto beneficieei da sua orientação científica e pelo enorme privilégio que considero toda a aprendizagem que me proporcionou, bem como a revisão crítica desta dissertação.

À Dr.ª Graça Barreiro, pelo ensinamento das técnicas experimentais posteriormente adaptadas ao desenvolvimento do trabalho prático, pela ajuda prestada no decorrer de todas as fases da elaboração do presente trabalho.

À Dr.ª Claudia Sánchez Lara um especial agradecimento pelo tempo e paciência dispensados em todos os momentos, por solucionar todas as dúvidas, pela revisão minuciosa desta dissertação e pelo incansável apoio.

Ao Eng.º Mário e à Ana Paula Ramos por todo o apoio e paciência infindável prestados no laboratório. À Isabel Pais, pela simpatia, pelo enorme trabalho no HPLC e pelo auxílio prestado em vários momentos no decurso do trabalho laboratorial. À Engenheira Margarida Santos, ao Engenheiro Eduardo Leitão e ao Engenheiro Armando Ferreira, pelo auxílio no laboratório para determinação de diversos parâmetros apresentados nesta dissertação.

À Diana Bértolo, pelo companheirismo vivido no local de trabalho, pela ajuda prestada sempre que foi solicitada, pela boa disposição e pela amizade.

À minha família e aos meus amigos, por compreender que o trabalho realizado foi, por vezes, incompatível com a presença, cuidados e atenção que lhes era devida e pelo incentivo constante.

À minha mãe, pelo amor que sempre demonstrou por mim.

À minha cunhada Patrícia Correia e ao meu irmão Pedro Pinho, pela enorme disponibilidade demonstrada para ajudar na parte informática.

Ao Tiago, meu namorado e amigo, que me deu ânimo em todas as fases da dissertação, pelo carinho e amor que sente por mim e que demonstrou ao longo destes 6 meses em que estivemos mais afastados.

À *Ruagropec*, na pessoa da Sr.ª Manuela Casimiro e do Sr. Rui Casimiro, pelo transporte das peras, por fornecerem as mesmas, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela simpatia e amabilidade com que sempre me trataram.

Aos meus tios, Maria Teresa e Vasco Folha, à D. Antonieta e à Maria por me terem recebido na sua casa.

Aos participantes da análise sensorial e a todos aqueles que de algum modo me ajudaram, muito obrigada.



Dedico esta dissertação às mulheres mais importantes da minha vida, a minha avó Maria Cândida, que já não está entre nós, por quem sinto uma enorme admiração e saudade e à minha mãe, Isabel, por todas as razões do mundo e mais alguma.

Resumo

A pêra 'Rocha', fruto muito apreciado, de origem portuguesa com Denominação de Origem Protegida (DOP), possui uma curta vida de prateleira quando minimamente processada, demonstrando uma clara necessidade do desenvolvimento de tecnologias que permitam prolongar o seu tempo de vida útil. O uso de biofilmes edíveis constitui uma vantagem na conservação de alguns frutos. Assim, no presente trabalho, foi estudada a aplicação do quitosano, um biofilme edível GRAS (generally recognized as safe) que, conjuntamente com o acondicionamento em atmosfera modificada a temperaturas de refrigeração, pretende estender o tempo de conservação de peras 'Rocha' fatiadas. As peras 'Rocha' foram fatiadas e imersas durante um minuto em soluções de quitosano, de peso molecular médio com um grau de desacetilação entre 75-77%, dissolvido em ácido ascórbico 0,5%, a pH 6, de diferentes concentrações (0, 0,7, 1, 1,5 e 2g/L). Ficaram a escorrer durante 3 minutos à temperatura ambiente e foram acondicionados em caixas de Petri (atmosfera normal) ou embaladas em atmosfera modificada (14-17% CO₂, 1-2% O₂ e 76-77% N₂), e colocados em câmaras de refrigeração a temperaturas entre os 4-5°C, durante 10 ou 16 dias, sem e com ATM, respectivamente. Foram efectuadas avaliações físico-químicas (SST, acidez titulável, dureza, compostos fenólicos, colorimetria, humidade e pH), microbiológicas, nutricionais (açúcares e ácido ascórbico) e sensoriais. A análise sensorial foi realizada por um painel composto por 16 provadores não treinados, com média de idades de 45 anos, num laboratório construído e equipado de forma adequada e normalizada para a realização das análises sensoriais. Foi apreciada a aceitabilidade do aspecto/cor, brilho, aroma, consistência, sabor e impressão global das fatias de pêra 'Rocha'. Quanto às características físico-químicas e nutricionais, não foi possível estabelecer uma relação directa com as diferentes concentrações de quitosano aplicadas às fatias da pêra 'Rocha'.

Os resultados das análises microbiológicas evidenciaram um efeito antimicrobiano do quitosano, detectável na quantificação de mesófilos (em fatias acondicionadas em ATM com 10 dias de conservação) e de fungos e leveduras com o mesmo tempo de conservação. Na maioria dos parâmetros analisados, os resultados da análise sensorial demonstraram que as fatias de pêra ao natural não apresentam diferenças significativas face àquelas que tiveram acção do quitosano ou ácido ascórbico (acondicionadas ou não em ATM).

Os resultados sobre o efeito da aplicação de quitosano na conservação da pêra 'Rocha' apontam para a importância da indústria, prosseguir os estudos relativos à utilização deste biofilme, complementado ou não com o embalamento em atmosfera modificada.

Palavras-chave: atmosfera modificada, conservação, pêra 'Rocha', quitosano.



Abstract

'Rocha' pear, a much appreciated fruit, originated in Portugal with a Denomination of Protected Origin (DOP), has a short shelf-life when minimally processed, what clearly shows the need of technology development to increase the shelf-life. The use of edible biofilms can increase the period of conservation of some fruits. In this background, the application of chitosan, a GRAS edible biofilm that, with the conditioning in modified atmosphere at refrigerated temperatures aiming an extend the shelf-life of 'Rocha' pears slices. 'Rocha' pear slices were immersed one minute in chitosan solutions with medium molecular weight and 75-77% deacetylato dissolved in ascorbic acid 0,5%, pH 6, of different concentrations (0, 0,7, 1, 1,5 e 2g/L). Samples were flowed during tree minutes at room temperature and conditioned in Petri boxes (normal atmosphere), or in modified atmosphere (14-17% CO₂, 1-2% O₂ e 76-77% N₂), and refrigerated at 4-5°C during 10 or 16 days, not conditioned or conditioned in modified atmosphere, respectively. Physical and chemicals assessments (total soluble solids, titratable acidity, hardness, phenolic compounds, colorimetric, humidity and pH) microbiological, nutritional (sugars and ascorbic acid) and sensory analysis were carried out. Sensory analysis was performed by a taster's panel composed of 16 non trained tasters with a medium age of 45 years old, using an appropriate sensory analysis laboratory. The aspect/color, brightness, smell, consistency, taste and overall impression of 'Rocha' pear slices were characterized. The results showed that it was not possible to establish a relationship among the studied parameters and the different chitosan concentrations applied at 'Rocha' pear slices. Microbiological results showed that only in the quantification of mesophilic, fungi and yeasts in slices conditioned in modified atmosphere with 10 days of conservation was observed a chitosan antimicrobial effect was observed. Sensory analysis showed that natural pear slices have no significant differences from slices dipped in chitosan and ascorbic acid, conditioned and not conditioned in modified atmosphere, in the most part of the analyzed parameters. The effect of chitosan in the conservation of 'Rocha' pear, points the high importance of the industry to further study the use of this biofilm, complemented or not with modified atmosphere packaging.

Keywords: modified atmosphere, chitosan, 'Rocha' pear, *shelf-life*.



Índice de Matérias

Índice de Matérias	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XV
Símbolos, siglas e abreviaturas	XVI
1. Introdução	1
1.1. Pêra 'Rocha' do Oeste	1
1.2. Produção de pêra 'Rocha' a nível mundial	3
1.3. Exportação de pêra 'Rocha'	4
1.4. Produtos minimamente processados, 4ª Gama ou <i>fresh cut</i>	5
1.5. Comercialização e consumo de produtos de 4ª Gama	5
1.6. Conveniência vs preço de produtos de 4ª Gama	6
1.7. Segurança alimentar e boas práticas de higiene no processamento de produtos de 4ª Gama	6
1.8. Biofilmes edíveis	7
1.9. Biofilmes de quitosano	7
1.10. Solubilidade do quitosano e da quitina	10
1.11. Características dos biofilmes de quitosano	10
1.12. Aplicações do quitosano	10
1.13. Actividade antimicrobiana do quitosano	11
1.14. Actividade antioxidante do quitosano	12
1.15. Biofilmes de quitosano: Legislação e toxicidade	13
1.16. Atmosfera modificada e a sua utilização na conservação dos frutos	13
1.17. Procedimento de incorporação de atmosfera modificada na embalagem	17
1.18. Embalagens e cuidados de transporte	17
1.19. Parâmetros avaliados para os diferentes tratamentos aplicados a peras 'Rocha'	18
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Material vegetal	25
2.2. Quitosano	25
2.3. Ensaio prévios de solubilidade do quitosano	25
2.4. Preparação das peras 'Rocha' e imersão em soluções de quitosano	26
2.5. Avaliação da cor	27
2.6. Avaliação do teor de humidade	28
2.7. Avaliação dos sólidos solúveis totais ou índice refractométrico	28
2.8. Avaliação da dureza	28
2.9. Avaliação da acidez titulável e do pH	29
2.10. Determinação do teor de glúcidos	29
2.11. Análise dos compostos fenólicos	30
2.12. Determinação do teor de ácido ascórbico	31
2.13. Análises microbiológicas	31



2.14. Análises sensoriais	33
2.15. Estatística	33
3. Resultados e discussão	34
3.1. Colorimetria	35
3.2. Teor de humidade	40
3.3. Sólidos solúveis totais	42
3.4. Dureza das fatias de pêra 'Rocha'	44
3.5. Acidez titulável e pH	46
3.6. Teor de glícidos	49
3.7. Compostos fenólicos	53
3.8. Ácido ascórbico	55
3.9. Análises microbiológicas	57
3.10. Análise sensorial	62
4. Conclusões e perspectivas futuras	66
5. Bibliografia	68
6. Anexos	75

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Distribuição geográfica da produção de pêra 'Rocha' (Soares, et. al., 2001).	4
Figura 1.2 – Estrutura química do quitosano (Borgognoni <i>et al.</i> , 2006).	7
Figura 1.3 – Processo de desacetilação da quitina (adaptado de Kristbergsson, 2007) (DA – Desacetilação).	9
Figura 1.4 – Comparação estrutural entre a quitina e os produtos obtidos da sua desacetilação, o quitosano e o quitano (adaptado de Velásquez, 2006).	9
Figura 1.5 – Comparação de padrões respiratórios quanto à evolução da taxa de respiração e de produção de etileno de órgãos climatéricos e não climatéricos (adaptado de Almeida, 2005).	14
Figura 1.6 – Alteração das concentrações de O ₂ e CO ₂ na atmosfera de produtos embalados com modificação passiva e activa da atmosfera (Zagory e Kader, 1988, o.p. Empis e Martins, 2000).	15
Figura 1.7 – Eixos dos valores de croma a* e b* e de L (adaptado de Pilon, 2007).	19
Figura 1.8 – Texturómetro.	21
Figura 2.1 – Processamento da pêra 'Rocha' minimamente processada.	26
Figura 3.1 – Variação da luminosidade ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e correspondentes controlos.	35
Figura 3.2 – Variação da coordenada colorimétrica a* ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	36
Figura 3.3 – Variação da coordenada colorimétrica b* ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	36
Figura 3.4 – Variação da luminosidade ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	37
Figura 3.5 – Variação da coordenada colorimétrica a* ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	38
Figura 3.6 – Variação da coordenada colorimétrica b* ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	39
Figura 3.7 – Variação do teor de humidade em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	40
Figura 3.8 – Variação do teor de humidade em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	41
Figura 3.9 – Variação do teor de SST em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	42
Figura 3.10 – Variação do teor de SST em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	43
Figura 3.11 – Variação da dureza das fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	44
Figura 3.12 – Variação da dureza das fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.	45

Figura 3.13 – Variação da acidez titulável em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.....	46
Figura 3.14 – Variação do pH em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.	47
Figura 3.15 – Variação da acidez titulável em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.....	48
Figura 3.16 – Variação do pH de fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.	49
Figura 3.17 – Cromatograma característico, obtido do HPLC, efectuado a fatias de pêra ‘Rocha’.....	50
Figura 3.18 – Variação do teor de glícidos em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, não acondicionadas em ATM.....	50
Figura 3.19 – Variação do teor de glícidos em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas em ATM.	52
Figura 3.20 – Variação do teor de compostos fenólicos em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos não acondicionadas em ATM.	53
Figura 3.21 – Variação do teor de compostos fenólicos em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas em ATM.	54
Figura 3.22 – Variação do teor de ácido ascórbico em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, não acondicionadas em ATM.....	55
Figura 3.23 – Variação do teor de ácido ascórbico em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas em ATM.	56
Figura 3.24 – Variação de mesófilos em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas ou não em ATM, 10 e 16 dias após o fatiamento.	57
Figura 3.25 – Colónias de microrganismos psicrófilos crescidas em placas de PCA inoculadas com sumo de fatias de pêra ‘Rocha’ imersas numa solução de quitosano de 1,5g/L, acondicionadas em ATM (da direita para a esquerda, diluições: 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}).	59
Figura 3.26 – Variação do número de UFC de microrganismos psicrófilos em fatias de pêra ‘Rocha’ (UFC/g) imersas em diferentes concentrações de quitosano e correspondentes controlos, acondicionadas ou não em ATM, 10 e 16 dias após o fatiamento.....	59
Figura 3.27 – Variação dos fungos e leveduras em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas ou não em ATM, 10 e 16 dias após o fatiamento.....	60
Figura 3.28 – Resultados da apreciação do aspecto/cor de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).	62
Figura 3.29 – Resultados da apreciação do brilho de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).	63

Figura 3.30 – Resultados da apreciação do aroma de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).	63
Figura 3.31 – Resultados da avaliação da consistência de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).....	64
Figura 3.32 – Resultados da apreciação do sabor de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).	64
Figura 3.33 – Resultados da impressão global de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).	65
Figura 6.1 – Folha de prova da análise sensorial.....	76
Figura 6.2 - Especificações do material da embalagem de ATM.	77





Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Informações nutricionais da pêra. Valores médios por 100g de parte edível (INSA, 2007).	2
Tabela 2.1 - Tratamentos a efectuar com diferentes concentrações da solução de quitosano e com diferentes tipos de atmosfera.	27
Tabela 2.2 - Dados para elaboração da curva padrão com ácido gálico.....	30
Tabela 3.1 - Caracterização dos lotes 1, 2 e 3 de peras utilizados nos ensaios.	34

Símbolos, siglas e abreviaturas

a* – Coordenada colorimétrica cartesiana
ACC – Oxidase (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano)
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ANP – Associação Nacional de Produtores de Pêra 'Rocha'
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro
ATM – Atmosfera modificada
ATP – Adenosina trifosfato
b* – Coordenada colorimétrica cartesiana
CE – Comunidade Europeia
CEE – Comunidade Económica Europeia
ED – Directiva Europeia
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético
FDA/ CFSAN – *Food and Drug Administration/ Center for Food Safety and Applied Nutrition*
GA₃ – Ácido Giberélico
GRAS – *Generally Recognized as Safe* (reconhecido como seguro)
HORECA – Hotéis, Restaurantes e Cafés
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFPA – *International Fresh-Cut Produce Association* ou Associação Internacional dos Produtores de Minimamente Processados
INE – Instituto Nacional de Estatística
IR – Índice refractométrico
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Km – Constante de Michaelis Menten
L* – *Lightness* – Luminosidade; claridade (no contexto da colorimetria)
N – Normal
NP – Norma Portuguesa
PCA – *Plate count agar*
PDA – *Potato dextrose agar*
PF – Peso fresco
pH – Potencial hidrogeniónico
pka – Parâmetro que mede a acidez ou basicidade de uma substância
PPO – Polifenoloxidase
SST – Sólidos Solúveis Totais
UFC – Unidades Formadoras de Colónias
UV / VIS – Ultravioleta / Visível
 λ – Comprimento de onda

1. Introdução

Portugal, em especial a região Oeste, é a zona de maior produção de pêra 'Rocha' a nível mundial, tendo sido produzidas no ano de 2010, 171248t (dados da ANP cedidos em 2011). Para além das características intrínsecas do produto, nomeadamente, uma polpa crocante, doce e sumarenta, a pêra 'Rocha' apresenta relativamente a outras variedades, o facto de ter uma excelente capacidade de conservação e resistência ao transporte e manuseamento. No entanto, quando minimamente processada, uma parte significativa da produção sofre danos que impossibilitam a sua comercialização e, por isso, a sua conservação requer condições específicas, devendo ser concretizada de forma rápida após processamento. O ponto de maturação deve atender às necessidades sensoriais do mercado a que se destina, bem como à aparência e consistência, entre outros atributos sensoriais. O objectivo deste trabalho é estudar os métodos de conservação atmosfera modificada e aplicação de quitosano, sua aplicabilidade em fatias de pêra 'Rocha' e o tempo de conservação deste fruto quando tratado com estes métodos de conservação. É ainda avaliar ao longo do tempo as alterações que ocorrem ao nível colorimétrico, microbiológico, nutricional, físico-químico e sensorial.

1.1. Pêra 'Rocha' do Oeste

A pêra 'Rocha' (*Pyrus communis* L. cv. Rocha) tem origem portuguesa e, provém da pereira 'Rocha', árvore que surgiu casualmente na "Fazenda do Sr. Pedro António Rocha", em Sintra, em 1836 (Soares *et al.*, 2001). Segundo o Regulamento CE nº 492/2003, de 18 de Março de 2003, a denominação "Pêra Rocha do Oeste" é inscrita como DOP, ao abrigo do registo das denominações de origem protegidas e das indicações geográficas protegidas criado pelo Regulamento CEE nº 2081/92. A pêra 'Rocha' possui uma epiderme com cor variando entre o amarelo e o verde claro, com carepa típica ao redor do pedúnculo, menos acentuada na zona apical e com leves pontuações dispersas na superfície do fruto. A intensidade da carepa depende das condições climáticas, dos tratamentos fitossanitários, da variação clonal e das características do local de plantação. A pêra 'Rocha' apresenta um pedúnculo comprido, lenhoso e fino que pode variar entre 28-35mm, na maioria dos casos. A sua polpa é branca, granulosa, macia-crocante, no caso de se tratar de uma maturação comercial, ou macia-fundente na maturação fisiológica. Geralmente é doce e sumarenta. A forma do fruto é variável, o que se deve a factores genéticos e à falta de sementes decorrente da partenocarpia (desenvolvimento do fruto sem fecundação, ou seja, sem recurso a sementes). Assim, desenvolvem-se formas mais arredondadas, devido a uma boa polinização e formas mais alongadas, decorrente do estímulo partenocárpico. O calibre (diâmetro na maior secção do fruto), varia com a forma da pêra, havendo assim peras com o mesmo calibre que apresentam pesos diferentes, caso sejam mais ou menos alongadas. Este facto deve-se a aplicações de ácido giberélico (GA₃) ou à partenocarpia natural. Em geral, a pêra 'Rocha' apresenta calibres entre 55-65mm, devido à escassez de recursos hídricos disponíveis na Região Oeste, à tradição da cultura em sequeiro e ao aproveitamento máximo

do vingamento. No entanto, podem desenvolver-se peras com calibres entre 65-75mm, caso os pomares sejam devidamente instalados, podados, mondados, irrigados e fertilizados.

Devido às ações do governo relativamente ao fomento frutícola, generalizou-se o uso de marmeleiros como porta-enxertos da pereira 'Rocha', o que permite à árvore possuir um tamanho inferior e uma ocorrência do início da frutificação mais rápida (Soares *et al.*, 2001).

A nível taxonómico, a pereira 'Rocha' pertence ao reino '*Plantae*', filo '*Magnoliophyta*', classe '*Magnoliopsida*', ordem '*Rosales*', família '*Rosaceae*', género '*Pyrus*' e variedade 'Rocha' (Adaptado de Smith, 2011). A composição nutricional da pêra encontra-se especificada na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Informações nutricionais da pêra. Valores médios por 100g de parte edível (INSA, 2007).

Nutrientes	Proporção
Proteínas (g)	0,3
Gordura total (g)	0,4
Glícidos (g)	9,4
Ácido linoleico (g)	0,1
Colesterol (mg)	0
Vitamina A (µg)	2
Caroteno (µg)	9
α-tocoferol (mg)	0,5
Tiamina (mg)	0,02
Riboflavina (mg)	0,02
Equivalentes de niacina (mg)	0,2
Niacina (mg)	0,2
Vitamina B6 (mg)	0,02
Vitamina C (mg)	3
Folatos (µg)	2
Sódio (mg)	8
Potássio (mg)	150
Cálcio (mg)	9
Fósforo (mg)	10
Magnésio (mg)	9
Ferro (mg)	0,3
Zinco (mg)	0,2

A pêra 'Rocha' é sensível ao roçar das folhas e ramos pela acção do vento, ao escaldão fisiológico que ocorre em câmaras frigoríficas ou após saída do frio, surgindo manchas castanhas superficiais na epiderme do fruto. O próprio manuseamento pode deixar marcas na epiderme, sobretudo nas colheitas mais tardias e quando as peras estão tempo excessivo nas câmaras de refrigeração. A

passagem nos calibradores também contribui para o surgimento de pequenas estrias de cor castanha. Relativamente à sensibilidade ao sol, a pêra 'Rocha' não é muito sensível. O período de colheita ocorre entre os meses de Agosto (15 a 20 dias depois da variedade William's) e Setembro, consoante o tipo de maturação pretendido e o objectivo comercial. Uma vez que possui uma boa capacidade de conservação, pode comercializar-se entre Agosto e Maio, desde que refrigerada. A região Oeste possui condições edafo-climáticas e geográficas próprias fundamentais ao desenvolvimento de peras 'Rocha' com as características típicas que lhe conhecemos. O clima é moderadamente chuvoso com uma precipitação anual entre 600 e 700 mm, temperado, com uma temperatura média anual de 15-16°C, oceânico na faixa litoral até cerca de 10 km da costa e possui uma estação do ano seca e quente. Caracteriza-se ainda por ter um reduzido número de dias de geada, sendo praticamente inexistente na fase plena de floração, e uma humidade do ar elevada que varia entre 75 e 85%. Quanto aos solos, na região Oeste as áreas de plantação correspondem na maior parte dos casos a terrenos de várzea ou aluviões, onde existe um relativo equilíbrio entre os teores de argila e areia fina e valores de pH entre 6 e 7,5 (Soares *et al.*, 2001).

1.2. Produção de pêra 'Rocha' a nível mundial

Mais de 99% da pêra 'Rocha' mundial é produzida em Portugal. O restante 1% provém de outros países, nomeadamente França, Espanha e Brasil. Da produção nacional, 95% provém da região Oeste. Portugal possui uma área de pereiras com cerca de 10000 hectares dos quais, mais de 97% correspondem à variedade 'Rocha'. Esta área plantada tem a capacidade de produzir cerca de 120 a 180 mil toneladas de pêra 'Rocha' por ano. A venda de pêra 'Rocha' leva a uma facturação de cerca de 120 000 000 € por ano (ANP, 2011).

De acordo com o Despacho nº 13021/99, 2ª Série, nº 158, de 9 de Julho de 1999 (9932 e 9933), os oito principais concelhos produtores de pêra 'Rocha' a nível nacional são: Cadaval, Bombarral, Torres Vedras, Caldas da Rainha, Alcobaça, Lourinhã, Óbidos e Mafra (Figura 1.1).



Figura 1.1 – Distribuição geográfica da produção de pêra ‘Rocha’ (Soares, et. al., 2001).

Destes, destaca-se o Cadaval com uma área de cultivo de 2073 hectares e um crescimento muito expressivo nas últimas décadas, tendo ultrapassado o concelho do Bombarral, cuja área plantada é de 1934 hectares, com apenas um aumento de produção de 2% nos últimos 10 anos. Estima-se que no corrente ano, 2011, a produção de pêra ‘Rocha’ seja superior à de 2010, segundo indicação da ANP.

1.3. Exportação de pêra ‘Rocha’

Na campanha de 2009/2010, os sócios da ANP (que se estima corresponderem a 67% do total de produtores nacionais) exportaram 80 025 ton de pêra ‘Rocha’, isto é, 61% do total produzido nesta campanha. Os principais mercados de exportação foram o Reino Unido para onde foram exportadas 21 458 ton de pêra ‘Rocha’, França com 19 713 e Brasil com 19 005. França e Brasil duplicaram o volume de encomendas face a 2006/2007. Ainda relativamente à última campanha, é de salientar o aumento de exportações para Espanha e para a Alemanha, que passaram de 956 ton para 2680 ton e 110 ton para 2024 ton, respectivamente (dados divulgados no XVI Encontro de Pêra Rocha do Oeste a 9 de Maio de 2011 na Sobrena, Concelho do Cadaval).

1.4. Produtos minimamente processados, 4ª Gama ou *fresh cut*

Adicionalmente ao consumo de fruta fresca inteira, não fatiada, a pêra 'Rocha' também poderá ser consumida na forma minimamente processada, com designação comercial de 4ª Gama, ou incorporada noutros produtos alimentares, como os iogurtes e os sumos, existindo mesmo um iogurte de pêra 'Rocha' da *Danone* e um sumo de pêra 'Rocha' da *Compal*.

Segundo a IFPA (International Fresh-Cut Produce Association), os produtos minimamente processados são definidos como “qualquer fruto ou vegetal, ou combinação destes, cuja forma original foi fisicamente alterada, mantendo-se no entanto no estado fresco” (IFPA, 1999). Estes produtos têm vindo a adquirir um grande interesse no mercado, pois são produtos convenientes, práticos e com qualidade levando o consumidor a despendar menos tempo na sua preparação. Acresce ainda apontar o interesse do consumidor em incluir na sua alimentação produtos naturais, saudáveis e frescos (Fonseca *et al.*, 2001), como é o caso da pêra 'Rocha'. Os produtos minimamente processados podem também ser designados por produtos de 4ª Gama, de acordo com a terminologia francesa ou *fresh cut*, segundo a americana.

1.5. Comercialização e consumo de produtos de 4ª Gama

Nos últimos anos, o volume de vendas de produtos minimamente processados tem vindo a aumentar gradualmente. Nos Estados Unidos, país onde surgiram estes produtos, a sua comercialização corresponde a 10% do volume de produtos hortofrutícolas e projecta-se um aumento de cerca de 20% para os próximos 10 anos.

Em Portugal, estes produtos surgiram na década de 90 (à excepção do caldo-verde), acompanhando lentamente a tendência global de diversificação dos alimentos (alface, cenoura ralada, espinafres, mistura de vários vegetais, diversos frutos, entre outros) e estímulo ao consumo, apresentando no ano de 2007 um valor estimado de 30 milhões de euros anuais (Díaz *et al.*, 2007).

Em Espanha, a comercialização de hortofrutícolas de 4ª Gama, representava em 2005, um volume de negócios de 200 milhões de euros. Em Agosto de 2007 atingiu um volume comercializado de 40,2 milhões de toneladas, o que corresponde a um aumento de 13,6% relativamente ao período homólogo de 2006. Do volume total comercializado em Espanha, cerca de 22% destina-se ao canal HORECA e os excedentes 78% à distribuição moderna (Soares, 2001).

Relativamente ao consumo de hortofrutícolas em Portugal, entre 1990 e 2003, verificou-se um aumento de 37% nestes produtos com capitação, em 2003, de 461,9 g/dia (INE, 2006). Esta situação permite ao país ocupar o quinto lugar entre os países da União Europeia mais consumidores de vegetais e frutos frescos, o que coincide com o perfil alimentar mediterrânico. Contudo, o consumo existente de hortofrutícolas é inferior ao recomendado para uma alimentação equilibrada, que deve incluir 4 a 5 peças por dia.

Ainda, dados do INE (2006) referentes ao período entre 1990 e 2003, revelam que os portugueses apresentam uma dieta alimentar francamente excedentária em gorduras e proteínas e proporcionalmente deficitária em frutos e hortícolas.

1.6. Conveniência vs preço de produtos de 4ª Gama

Um aspecto de extrema importância relativo ao comportamento do consumidor face à aquisição dos produtos minimamente processados, é o facto do preço ser superior ao dos frutos e vegetais não processados. No entanto, aspectos como a diminuição do tempo disponível e, muitas vezes da vontade, para processar alimentos, fazem com que o consumidor esteja disposto a pagar por este serviço de conveniência, tal como é revelado pelo crescimento do mercado destes produtos.

Os investigadores e a indústria alimentar pretendem, por isso, prolongar o período durante o qual o alimento permanece adequado para o consumo, aumentar a variedade da dieta, fornecer os nutrientes necessários para a manutenção da saúde e gerar lucros para os produtores (Fellows, 2006).

1.7. Segurança alimentar e boas práticas de higiene no processamento de produtos de 4ª Gama

Após a colheita, muitos produtos hortícolas não chegam a ser consumidos, devido a alterações fisiológicas indesejáveis decorrentes das operações de manuseamento, que induzem a perda de integridade celular da superfície cortada, reacções de escurecimento, alterações da textura, sabor e aroma e morte dos órgãos vegetais, decorrente dos processos de senescência, abrasão ou ruptura que reduzem o tempo de vida útil (Lima, 2000; Almeida, 2005). A presença de microrganismos na superfície do fruto também pode comprometer a segurança do fruto minimamente processado. Neste contexto, as Boas Práticas de Higiene durante o processamento e embalamento de frutos e hortícolas frescos de 4ª Gama, prontos para consumo, constituem um pré-requisito fundamental. A sua importância é ainda reconhecida por diferentes entidades mundiais com responsabilidades ao nível da segurança alimentar. Assim, tendo em conta a segurança alimentar, numa perspectiva de harmonização do mercado global, a Comissão do *Codex Alimentarius* desenvolveu um anexo ao *Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables* (Código de Boas Práticas de Higiene de frutos e produtos hortícolas frescos) (13/03/2007, aprovado a 28/02/2008), que reúne um conjunto de procedimentos de higiene úteis para a indústria de alimentos minimamente processados actualmente em expansão (FDA/ CFSAN, 2007).

1.8. Biofilmes edíveis

Para além das Boas Práticas de Higiene, as perdas de pós-colheita também podem ser minimizadas pelo uso de biofilmes edíveis e, adicionalmente, com aplicação de atmosfera modificada. A utilização destes biofilmes tem sido estudada para uso como revestimento de frutos e hortícolas frescos, nomeadamente os produtos minimamente processados, com o intuito de minimizar a perda de humidade, reduzir as taxas respiratórias, oxidações, alterações de cor, melhorar a textura de alguns frutos e conduzir a um aumento do tempo de conservação (Kester e Fennema, 1986; Durango *et al.*, 2006), uma vez que agem como barreiras a elementos externos como bactérias, compostos orgânicos voláteis, gases (como o oxigénio), entre outros (Phisalaphong e Jatupaiboon, 2008).

Os biofilmes aumentam a relação de desempenho durante a desidratação osmótica, reduzem o crescimento microbiano e retêm compostos de aroma. A aplicação de biofilmes comestíveis com esse propósito constitui uma importante vantagem económica.

1.9. Biofilmes de quitosano

O quitosano é um polissacarídeo de origem natural que tem sido alvo de intensa investigação nas últimas décadas, cuja fórmula molecular é $(C_8H_{13}NO_5)_n$. O quitosano pode formar biofilmes e, por isso, pode ser utilizado como revestimento, nomeadamente, em frutos minimamente processados.

É um polissacarídeo catiónico linear, composto por unidades de glucosamina unidas a unidades de acetilglucosamina por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Peniche *et al.*, 2003). O quitosano obtém-se industrialmente por um processo de desacetilação da quitina e possui a seguinte estrutura química:

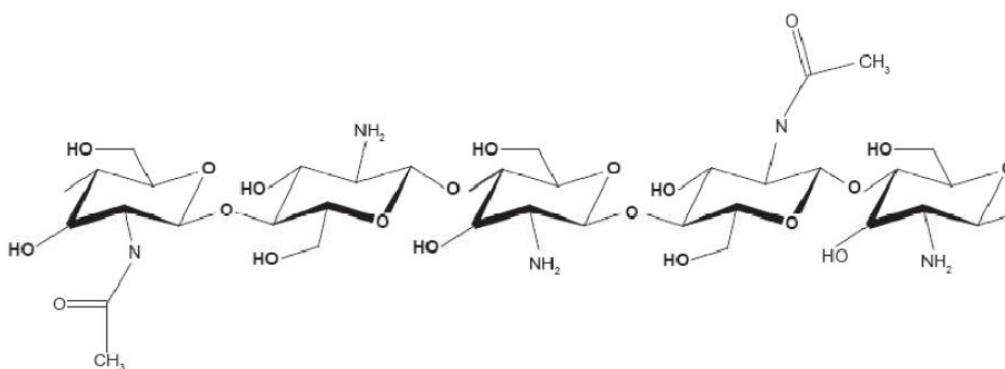


Figura 1.2 – Estrutura química do quitosano (Borgognoni *et al.*, 2006).

A quitina, precursora do quitosano, está presente no exosqueleto de alguns artrópodes, nomeadamente, crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo, entre outros), nos insectos e nas paredes celulares de determinados fungos (Prashanth *et al.*, 2002; Rinaudo, 2006; Chesnutt *et al.*, 2007). Nos insectos e nos crustáceos, a quantidade de quitina corresponde a aproximadamente 1,4% e 15-20% respectivamente (Antonino, 2007). É o segundo polímero mais abundante na natureza, sendo apenas

superado pela celulose (Devlieghere *et al.*, 2004). Como abundante resíduo de indústrias, faz com que seja um recurso economicamente atractivo para a produção de quitosano devido às suas características de extremo interesse no sector alimentar (Teng *et al.*, 2001; Gil e Ferreira, 2006), nomeadamente, a biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, possuir propriedades de adsorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, actividade antibacteriana, antifúngica e antivírica e poder hemostático. Grande parte destas características pode estar relacionada com a sua natureza catiónica. Assim, a pH ácido, é um polieletrólito com elevada densidade de carga, positiva por resíduo de glucosamina, interagindo com moléculas carregadas negativamente, destacando-se as proteínas, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos (Gil e Ferreira, 2006).

A quitina é constituída predominantemente por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose, e o quitosano é maioritariamente formado por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (Mathur, 1990; Roberts, 1992). A quitina, dependendo da fonte de obtenção, existe na natureza nas formas polimórficas ' α ' e ' β ' (alfa e beta). Ocorre ainda uma terceira morfologia, a γ -quitina, que constitui uma variante da família ' α '. A forma ' α ' é a mais abundante. A nível industrial, a quitina obtém-se do exosqueleto dos crustáceos, por tratamento ácido para a dissolução do carbonato de cálcio, seguido de extracção alcalina para a solubilização das proteínas. Por fim, sofre uma etapa de descoloração para remover quase na totalidade a pigmentação, o que é indispensável para determinadas aplicações (Rinaudo, 2006).

Devido à baixa solubilidade da quitina, a sua aplicabilidade é restrita, o que se deve ao facto da sua estrutura cristalina ser de difícil modificação química, sobretudo na forma α -quitina, devido à existência de ligações de hidrogénio muito fortes entre as cadeias poliméricas. Assim, a quitina é submetida a um processo designado por desacetilação, para remoção dos grupos acetil. A conversão da quitina em quitosano pode ocorrer por desacetilação alcalina homogénea, heterogénea ou por meios enzimáticos (Prashanth *et al.*, 2002; Peniche *et al.*, 2003). O processo de desacetilação também pode ser efectuado em meio ácido, embora não seja muito comum, pois as ligações glicosídicas são susceptíveis à hidrólise ácida. A desacetilação alcalina é a mais utilizada, embora não tenha por objectivo obter quitosano totalmente desacetilado, isto é, com uma reacção 100% completa. Este processo requer reacções severas, altas temperaturas, concentrações de base elevadas e tempos de reacção longos, para que ocorra a degradação das cadeias e se obtenham produtos de baixo peso molecular (Campana e Signini, 2001; Prashanth *et al.*, 2002). Um dos processos de desacetilação alcalina da quitina está representado na Figura 1.3.

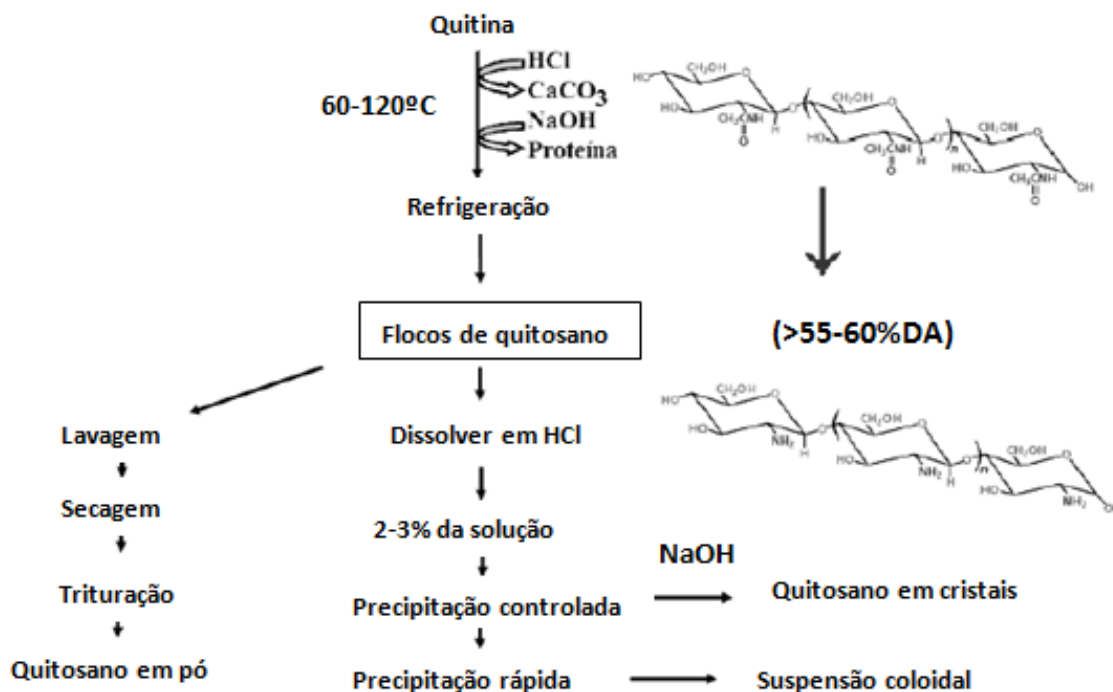


Figura 1.3 – Processo de desacetilação alcalina da quitina (adaptado de Kristbergsson, 2007) (DA – Desacetilação).

Quando se pretende obter quitosano de elevado peso molecular deve evitar-se a desacetilação da quitina por fusão alcalina e o emprego de soluções alcalinas concentradas durante tempos prolongados a temperaturas elevadas (adaptado de Roberts, 1992).

A quitina difere do quitosano no número de grupos acetil. Desta forma, depois do processo de desacetilação, quando se remove mais de 50% de grupos acetil, a quitina já foi “transformada” em quitosano (Moura, 2006). Quando na reacção de desacetilação são removidos 100% dos grupos acetil, o produto final é o quitano, cuja comparação ao nível estrutural com a da quitina e do quitosano se encontra esquematizada na Figura 1.4.

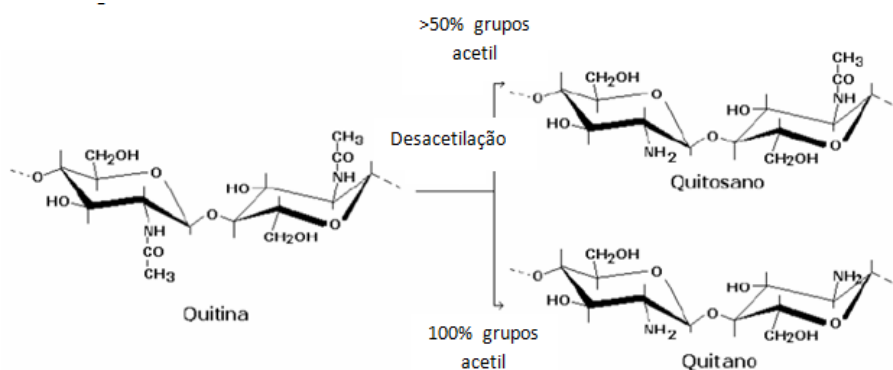


Figura 1.4 – Comparação estrutural entre a quitina e os produtos obtidos da sua desacetilação, o quitosano e o quitano (adaptado de Velásquez, 2006).

1.10. Solubilidade do quitosano e da quitina

O quitosano obtido por desacetilação heterogênea não é solúvel em água, contrariamente ao quitosano obtido por desacetilação homogênea (Peniche *et al.*, 2003). A solubilidade do quitosano está também relacionada com a proporção de desacetilação, o pH, a concentração iônica, a natureza do ácido usado para a protonação e a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, assim como as condições de extração deste polissacarídeo (Rinaudo, 2006). Assim, o quitosano é insolúvel a pH elevado, isto é, próximos da neutralidade, uma vez que os grupos amina estão desprotonados. O quitosano insolúvel em água é no entanto solúvel em alguns ácidos orgânicos (como o ácido acético, fórmico, cítrico) e inorgânicos diluídos (como o ácido clorídrico, nítrico e perclórico), devido à protonação dos grupos amina. Para uso do quitosano na indústria alimentar é mais apropriado solubilizá-lo em ácido acético, cítrico, málico e ascórbico nas proporções apropriadas (Okuyama *et al.*, 2000).

1.11. Características dos biofilmes de quitosano

Os biofilmes de quitosano são resistentes à ruptura, de longa duração, flexíveis (possuem elasticidade), tendo ainda a vantagem de serem edíveis (Kittur e Tharanathan, 2003). O quitosano pode formar, para além dos biofilmes, soluções de viscosidade controlada, géis, membranas, microesferas e nanopartículas (Campana *et al.*, 2001). Possui propriedades de barreira indispensáveis para prolongar a vida útil de armazenamento de frutos, por inibição do crescimento de fungos (Pereda *et al.*, 2008).

Os biofilmes de quitosano modificam a atmosfera interna do fruto sem causar respiração anaeróbia, uma vez que a sua permeabilidade é selectiva, sendo mais permeáveis ao O₂ do que ao CO₂ (Bai *et al.*, 1988). Reduzem as perdas por transpiração e controlam também os níveis de etileno produzidos pelos frutos, prolongando o tempo de armazenamento e controlando a deterioração dos produtos pelo retardamento da maturação (No *et al.*, 2007).

A maiores concentrações de quitosano, correspondem maiores coeficientes de adesão e de coesão. Da mesma forma, a espessura, a opacidade e a resistência à transferência de massa dos filmes resultantes, também aumenta (Srinivasa *et al.*, 2003; Casariego *et al.*, 2007).

1.12. Aplicações do quitosano

As características do quitosano tornam-no atractivo para aplicações na indústria alimentar, nomeadamente como fibra dietética, bactericida, recobrimento de frutas (biofilmes edíveis), mas também noutros sectores como a indústria biomédica, química, (Kester e Fennema, 1986; Labuza e Breene, 1989; Kittur *et al.*, 2001) farmacêutica, cosmética, têxtil, tratamento de águas e mesmo na agricultura (No *et al.*, 2007). Neste caso pode ser utilizado em adubos para plantas, tratamento de água, como floculante para clarificação, para remoção de iões metálicos, como polímero ecológico e para redução de odores e detecção de pesticidas (Du *et al.*, 2007; Yoshizuka *et al.*, 2007). Na

indústria de cosméticos, como esfoliante para a pele, tratamento para a acne, para hidratação capilar e para incorporação em pasta de dentes e na indústria farmacêutica, como antitumoral, hemostático e anticoagulante. Contudo, a sua maior aplicação ocorre ao nível da área biomédica em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstruções ósseas, lentes de contacto e encapsulamento de materiais (Rinaudo, 1989). Tem ainda a capacidade de regenerar tecidos epiteliais (Kariman, 2007; Niekraszewicz *et al.*, 2007), potenciar a osteogénese (Muzzarelli C. e Muzzarelli R.A.A., 2002; Hamilton *et al.*, 2005), absorver gordura e diminuir o colesterol sérico (Kim e Rajapakse, 2005; Feofilova, 2007). Neste contexto, o quitosano, depois de ingerido, no ambiente ácido do estômago, absorve a gordura durante a digestão. No intestino, em ambiente básico, a gordura absorvida pelo quitosano é solidificada e, posteriormente, eliminada pelas fezes, sendo desta forma um auxiliar no controlo de dietas com excesso de gordura, (Mathur, 1990).

1.13. Actividade antimicrobiana do quitosano

A actividade antimicrobiana é uma das propriedades mais importantes do quitosano, sendo eficaz contra uma vasta gama de fungos, leveduras e bactérias em produtos alimentares (No *et al.*, 2007), contudo esta propriedade é mais expressiva quando o quitosano se encontra em solução, numa gama de pH inferior a 6 e depende fundamentalmente das características da molécula de quitosano, nomeadamente, a massa molecular e o grau de desacetilação. Outros factores que influenciam a actividade antimicrobiana do quitosano são: composição do alimento, acidez, presença de iões, proteínas, lípidos, condições ambientais de elaboração da solução, temperatura, humidade relativa, entre outras, e tipo de microrganismos (Devlieghere *et al.*, 2004).

Segundo Tsai *et al.* (2002), o quitosano possui um maior poder antimicrobiano em bactérias do que em fungos. Alguns estudos sobre a actividade antimicrobiana do quitosano, revelam que esta sucede devido a alterações da permeabilidade das células, uma vez que ocorrem interações entre as cargas positivas das moléculas do quitosano e as cargas negativas das membranas celulares dos microrganismos que levam à perda dos constituintes intracelulares, provocando destruição e morte celular (Zivanovic *et al.*, 2005). Outro mecanismo antimicrobiano do quitosano é a interacção de produtos da hidrólise com o ADN microbiano, o que leva à inibição do ARNm e, conseqüentemente, à síntese proteica e à quelação de metais e de nutrientes essenciais para as bactérias (Sudarshan *et al.*, 1992).

Vários estudos demonstraram que o quitosano é um eficiente agente antimicrobiano contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Li *et al.*, 2007; Zheng e Zhu, 2003), *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella entérica*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* (Yadav e Bhise, 2004), *Listeria monocytogenes* (Coma *et al.*, 2002), *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*

(Costa *et al.*, 2006), *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* (Rhodes e Roller, 2000; Sagoo *et al.*, 2002).

A actividade antimicrobiana do quitosano relativamente a bactérias Gram-positivas, é progressivamente maior, quanto maior for a massa molecular do polímero. Em relação às bactérias Gram-negativas, quanto menor for a massa molecular do quitosano, maior será o seu poder antimicrobiano. No caso das bactérias Gram-positivas, o quitosano de elevado peso molecular forma um filme à volta da célula, o que inibe a absorção de nutrientes. Já no caso das bactérias Gram-negativas, o quitosano de baixo peso molecular, penetra com facilidade na célula, ligando-se ao ADN e impedindo a transcrição e transdução, o que provoca distúrbios no metabolismo celular (Helander *et al.*, 2001; Zheng e Zhu, 2003; Devlieghere *et al.*, 2004; Kim e Rajapakse, 2005; Prashanth e Tharanathan, 2006).

Estudos de Tsai e Hwang (2004) sobre a actividade antibacteriana do quitosano *in vitro* em relação a algumas bactérias patogénicas, revelaram que, para o quitosano com grau de desacetilação entre 70-95%, a concentração letal mínima para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahemoliticus*, *Listeria monocytogenes* e *Shigella dysenteriae* foi de 50-200 ppm, enquanto para *Clostridium perfringens* e bactérias probióticas dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foi de 250 e 500-1000 ppm, respectivamente.

Em soluções ácidas o quitosano tem um comportamento de polielectrólito catiónico, sendo o seu pKa de 6,3 a 7, consoante grau de desacetilação (Pinto, 2005) para pH elevado. Normalmente, a partir de pH \approx 6 o quitosano que se encontra dissolvido começa a precipitar devido à desprotonação dos grupos amina (Cruz *et al.*, 2000). A pH 7, uma vez que o quitosano se encontra acima do seu pKa, existem menos grupos amina protonados, o que desfavorece a interacção com a membrana celular dos microrganismos e a configuração da molécula, diminuindo desta forma a capacidade antibacteriana (Tsai e Hwang, 2004). Provoca ainda mudanças morfológicas em fungos fitopatogénicos (patogénicos de plantas) como: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotiosclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloesporioides* (Bãnos *et al.*, 2006), *Aspergillus Níger*, entre outros, e induz a desorganização molecular (Plascencia *et al.*, 2003).

Para além do efeito antibacteriano e antifúngico, o quitosano também é um quelante de iões metálicos, podendo interferir na produção de toxinas microbianas (Borderías *et al.*, 2005).

1.14. Actividade antioxidante do quitosano

Nos produtos hortofrutícolas, o quitosano evita o escurecimento enzimático, devido à capacidade para complexar iões metálicos, como o cobre. A polifenoloxidase (PPO), enzima responsável por esta reacção (escurecimento enzimático), possui um átomo de cobre no centro activo e promove a oxidação, actuando na hidroxilação de monofenóis a dihidroxifenóis e, posteriormente, oxidando-os a o-quinonas. A actividade desta enzima ocorre predominantemente a valores de pH entre 3,5-6

(Araújo, 1999; Assis, 2003). Assim, o quitosano utilizado como biofilme de revestimento de frutos, bloqueia os dois componentes indispensáveis ao escurecimento enzimático, o oxigênio e a própria enzima (PPO).

Joas *et al* (2005), estudaram o efeito da aplicação de quitosano no acastanhamento de lichias que resulta da actividade da PPO. Na presença de oxigênio, esta enzima converte os compostos fenólicos em pigmentos de cor acastanhada. Zhang e Quantick (1997) concluíram que os biofilmes de quitosano (1% e 2% dissolvido em 2% de ácido glutâmico) retardaram alterações no teor de antocianinas, flavonóides, compostos fenólicos e na actividade da PPO. A taxa de acastanhamento de lichias com biofilmes de quitosano depende da quantidade inicial de água no pericarpo (Caro e Joas, 2005), do pH do pericarpo e da taxa de desidratação durante o armazenamento (Joas *et al*, 2005). A aplicação de quitosano em tomate (1% e 2% em 0,25N HCl) também reduz a taxa respiratória e a produção de etileno, verificando-se uma maior eficácia com 2% de quitosano. O tomate tratado com biofilme de quitosano retardou o processo de senescência, evidenciado pela maior firmeza, maior acidez titulável e menor pigmentação vermelha que o controle, armazenado a 20°C (El Ghaouth *et al.*, 1992).

Estes e outros estudos demonstraram que os biofilmes de quitosano possuem a capacidade de prolongar o tempo de conservação e retardar a senescência de frutos e hortícolas, porque diminuem a taxa de respiração, evitam a oxidação e atrasam o amadurecimento devido ao retardamento da produção de etileno e de dióxido de carbono.

1.15. Biofilmes de quitosano: Legislação e toxicidade

O quitosano não consta da lista de aditivos autorizados na legislação Europeia vigente. Contudo, quanto à toxicidade do quitosano, comparando-a à da glicose e da sacarose, é menor. A dose letal de glicose em mamíferos é de cerca de 8 a 12 gramas, enquanto que 18 gramas de quitosano por quilograma de massa corporal em mamíferos não provoca qualquer toxicidade e, muito menos, um efeito letal (Craveiro *et al.*, 1999; Yadav e Bhise, *et al.*, 2004). Aliás, o quitosano é benéfico e seguro para o consumo humano, embora, como qualquer outra substância, se utilizada de forma inadequada ou em excesso possa ser nociva para o organismo (Quin *et al.*, 2006). Os problemas decorrentes de doses excessivas de quitosano registados foram a desidratação gástrica e a ocorrência do aumento do volume da mesma, uma vez que é uma fibra natural que em meio ácido se expande, formando um gel no estômago (Costa *et al.*, 2006).

1.16. Atmosfera modificada e a sua utilização na conservação dos frutos

A utilização de atmosfera modificada na conservação de frutos pode complementar o uso dos biofilmes edíveis de quitosano. É um método de conservação em que se altera a composição gasosa

em contacto com os alimentos, sendo muito utilizado em produtos hortofrutícolas minimamente processados, para diminuir a taxa de respiração, que é superior à do fruto inteiro. A atmosfera introduzida na embalagem caracteriza-se por possuir teores de dióxido de carbono e de oxigénio, respectivamente superiores e inferiores aos do ar. Tal pode, potencialmente, diminuir a taxa respiratória, a produção de etileno (Almeida, 2005) e a sua sensibilidade. As alterações relacionadas com o ataque microbiano e outras alterações fisiológicas, como a oxidação dos tecidos (Kader *et al.*, 1989; Fonseca *et al.*, 2002), são de igual modo afectadas satisfatoriamente pela atmosfera modificada.

Os frutos frescos são órgãos vivos e devem permanecer como tal durante o período de pós-colheita, mantendo o processo respiratório. Este é fundamental para a obtenção de energia para o metabolismo celular, possuindo por isso um papel fulcral no metabolismo vegetal e mantendo a produção de etileno (Almeida, 2005). A pêra inteira possui uma taxa de respiração moderada, na ordem dos 10 a 20 mg CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ à temperatura de 5°C, de acordo com Kader (2002). Consta-se que, em geral, a taxa de respiração é directamente proporcional ao teor de água nos tecidos (Almeida, 2005) que, segundo o INSA (2007), é de cerca de 85% na pêra. A produção de etileno neste produto é classificada como sendo ‘alta’, variando de 10 a 100 µL.kg⁻¹.h⁻¹ (numa escala onde consta a seguinte classificação: ‘muito baixa–0,01 a 0,1µL.kg⁻¹.h⁻¹’, ‘baixa–0,1 a 1,0µL.kg⁻¹.h⁻¹’, ‘moderada–1,0 a 10µL.kg⁻¹.h⁻¹’, ‘alta–10 a 100µL.kg⁻¹.h⁻¹’ e ‘muito alta>100µL.kg⁻¹.h⁻¹’) (Kader, 2002). Quando este fruto é fatiado (minimamente processado), a sua taxa de respiração e a de produção de etileno são superiores à do fruto inteiro, portanto, superiores aos valores referidos. Contudo, esta pode ser atenuada pela aplicação de atmosfera modificada com consequente extensão do *shelf-life*. A pêra é um fruto climatérico, o que lhe permite, depois de ser colhido, continuar a amadurecer mesmo sem estar ligada à planta-mãe, o que é extremamente importante porque permite colher o fruto verde (não amadurecido), compatível com tempos de transporte mais longos para os locais de venda. A Figura 1.5 compara a taxa de respiração de frutos climatéricos e não climatéricos.

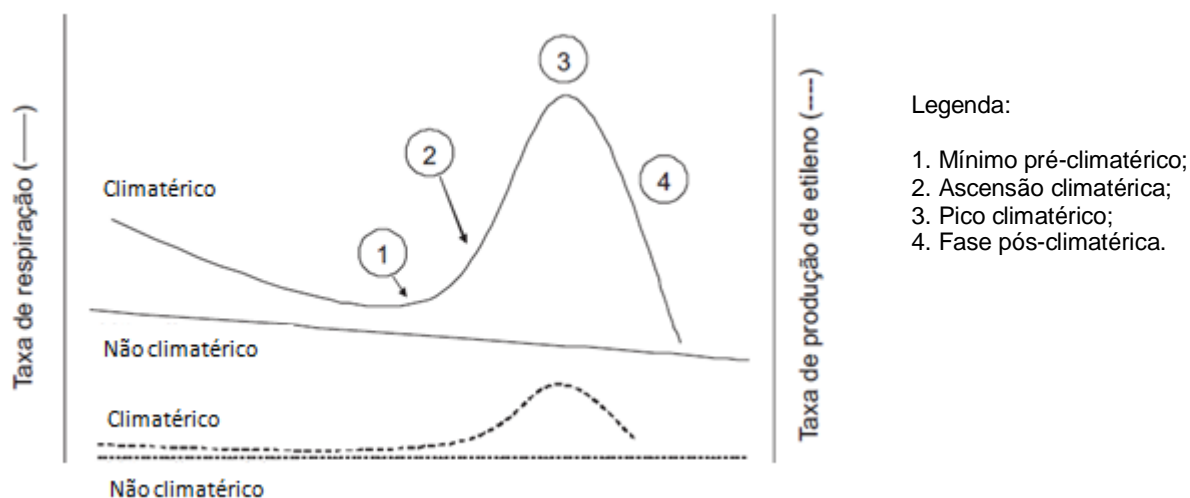


Figura 1.5 – Comparação de padrões respiratórios quanto à evolução da taxa de respiração e de produção de etileno de órgãos climatéricos e não climatéricos (adaptado de Almeida, 2005).

Durante a maturação os frutos passam pela fase de 'mínimo pré-climatérico', que ocorre antes do aumento brusco da actividade respiratória, definida como 'crise climatérica'. Nesta fase, ocorrem no fruto profundas e rápidas modificações bioquímicas como a hidrólise do amido, o aumento do teor dos açúcares, a solubilização da protopectina e a modificação dos pigmentos da epiderme, entre outras (Porrit, 1964).

Com a alteração da atmosfera envolvente, por diminuição do teor de O_2 e aumento do CO_2 , o metabolismo dos produtos vegetais e a produção de etileno são reduzidos, sendo preservada durante mais tempo a sua qualidade e tempo de vida útil. A diminuição da concentração de oxigénio leva também à redução da velocidade de reacção das enzimas que catalisam a oxidação, nomeadamente a polifenoloxidase, dado que o oxigénio é um dos seus substratos. Desta forma, a aplicação de atmosfera modificada tende a evitar o escurecimento dos tecidos (Aquino, 2006).

A modificação da atmosfera pode ser passiva ou activa (Figura 1.6). Na modificação passiva, os produtos vegetais são acondicionados em embalagens semipermeáveis (microperfuradas) em que a atmosfera no interior da embalagem é alterada pela própria respiração do produto. Desta forma o produto hortofrutícola vai consumir O_2 e libertar CO_2 , aumentando a concentração deste gás no interior da embalagem (Empis e Martins, 2000).

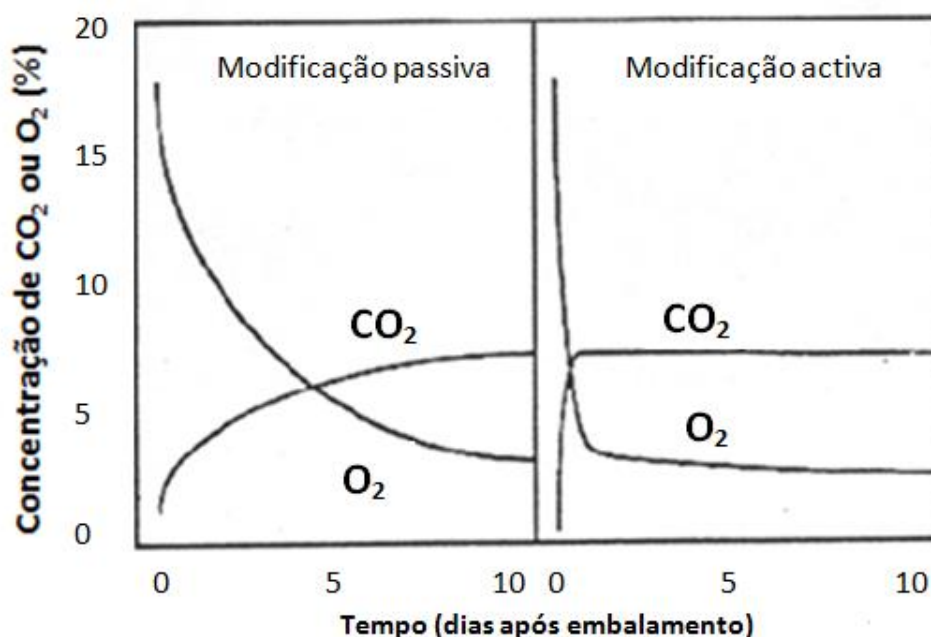


Figura 1.6 – Alteração das concentrações de O_2 e CO_2 na atmosfera de produtos embalados com modificação passiva e activa da atmosfera (Zagory e Kader, 1988, o.p. Empis e Martins, 2000).

O tipo de atmosfera modificada utilizada neste estudo é a atmosfera modificada activa. Na modificação activa, os produtos hortícolas são acondicionados em embalagens também semipermeáveis mas, neste caso é incorporada no interior da embalagem uma mistura de CO_2 e N_2 adequada, permanecendo uma pequena percentagem do oxigénio já existente na embalagem.

Os teores de gases e o tipo de filme da embalagem são determinantes para a qualidade, segurança e extensão do tempo de vida útil do produto (Fonseca *et al.*, 2002; Montanez *et al.*, 2005). A escolha correcta das proporções a utilizar é possível, conhecendo com rigor a taxa respiratória (medida em termos de O_2 consumido e de CO_2 produzido) do produto a embalar, em função do seu processamento (tipo de corte, desinfecção, etc.) e das condições de conservação (tempo, temperatura, humidade relativa, etc.).

O objectivo de ambos os tipos de embalamento em atmosfera modificada, passivo ou activo, é a criação de uma atmosfera gasosa de equilíbrio óptima no interior da embalagem, onde a actividade respiratória do produto seja tão minimizada quanto possível e que, ao mesmo tempo, assegure que os níveis de O_2 e CO_2 não sejam lesivos para o produto (Laurilla e Ahvenainen, 2002).

Segundo Kader *et al.* (1989), os frutos e vegetais minimamente processados possuem menos barreiras à difusão dos gases comparativamente aos produtos intactos, e por isso, toleram concentrações superiores de CO_2 e inferiores de O_2 . Contudo, os mesmos revelam que os efeitos do *stress* devido à exposição a composições atmosféricas inadequadas podem ser ampliados por outros factores como, danos causados no corte, frio ou calor, danos mecânicos (devido a impacto, compressão ou vibração/abrasão) ou radiação ionizante, concluindo que os produtos minimamente processados possuem maior sensibilidade a composições atmosféricas que ultrapassem os limites de tolerância. Desta forma, existe uma especificidade de condições para cada fruto e mesmo para diferentes variedades do mesmo fruto (por possuírem taxas respiratórias e taxas de produção de etileno distintas).

Na atmosfera modificada, a concentração de O_2 e de CO_2 na atmosfera envolvente do produto depende da massa de produto que está no interior da embalagem, da temperatura do mesmo e do ar circundante, tipo e espessura do filme de plástico, condensação de humidade na superfície do filme, velocidade do ar na face exterior do filme, taxas respiratórias e de produção de etileno (Almeida, 2005).

No metabolismo respiratório, nem todo o oxigénio consumido pelo tecido do fruto é reduzido na cadeia de transporte de electrões, por isso, o restante oxigénio está disponível para participar em reacções de oxidação. Quando a atmosfera é modificada, ocorre um abaixamento do teor de oxigénio e as oxidases, enzimas com baixa afinidade para o oxigénio (elevado K_m) que utilizam o O_2 como substrato, nomeadamente, a oxidase alternativa, a oxidase do polifenol, a oxidase do ACC e a lipoxigenase, são as primeiras a ser afectadas. Desta forma ocorre uma inibição das reacções de oxidação, conduzindo a uma menor degradação do fruto, o que constitui uma vantagem da alteração da atmosfera envolvente do fruto.

As oxidases dos órgãos vegetais que maior interesse possuem no contexto da qualidade dos produtos hortofrutícolas são a oxidase do citocromo c, de alta afinidade e baixo K_m , (que participa no metabolismo respiratório), a oxidase alternativa (que está envolvida no metabolismo respiratório sem produção de ATP), a oxidase do polifenol (que provoca a oxidação dos compostos fenólicos –

acastanhamento enzimático), a ACC oxidase (que sintetiza etileno) e a lipoxigenase (que provoca a peroxidação de ácidos gordos) (Almeida, 2005).

1.17. Procedimento de incorporação de atmosfera modificada na embalagem

A embalagem com atmosfera modificada activa, é submetida a uma corrente de azoto para varrimento e expulsão do oxigénio do seu interior, sendo injectada uma mistura gasosa, imediatamente antes da selagem da embalagem. (Campotec, 2011). Caso estas embalagens sejam mal seladas, o oxigénio entrará no seu interior e o produto oxidará rapidamente, ficando deteriorado. Depois do acondicionamento em atmosfera modificada, as embalagens devem ser refrigeradas devido à forte influencia da temperatura na taxa respiratória do produto (Talasila *et al.*, 1995; Jacxsens *et al.*, 2000).

O tempo de conservação de peras 'Rocha' minimamente processadas e acondicionadas em atmosfera modificada, com posterior refrigeração, é de 7 dias em perfeitas condições, embora na realidade este prazo se estenda até 10 dias. Esta medida de segurança é importante para dar tempo ao transporte do produto desde o supermercado até ao frigorífico do consumidor, onde a temperatura de conservação não é tão baixa como a das câmaras frigoríficas das empresas (dados da Campotec cedidos em 2011). Depois de aberta, a embalagem deve ser fechada, podendo o produto ser mantido durante cerca de 24h no frigorífico.

1.18. Embalagens e cuidados de transporte

No que diz respeito às características físicas das embalagens de frutos e hortícolas minimamente processados, a que assume maior relevo é a transparência, uma vez que permite a apreciação visual do produto, tornando-o mais apelativo ao consumidor (Ragaert *et al.*, 2004).

O controlo da temperatura é de importância extrema no armazenamento, transporte e distribuição dos produtos embalados. A dependência entre temperatura e velocidade à qual ocorrem os processos degradativos tem sido longamente descrito. Devido à sua instabilidade microbiológica e actividade fisiológica, este tipo de produtos deve permanecer a temperaturas de refrigeração, entre os 0-5°C, para que o seu tempo de vida útil seja compatível com o tempo de distribuição dentro da área de consumo (Ahvenainen, 1996). Os benefícios da utilização de temperaturas de refrigeração em produtos minimamente processados foram demonstrados ao nível da qualidade microbiológica (Zwietering *et al.*, 1994; Francis e O'Beirne, 2001), e da diminuição do metabolismo (Jacxsens *et al.*, 2000).

Para a obtenção de peras 'Rocha' minimamente processadas de boa qualidade, é fundamental que a matéria-prima utilizada seja de excelente qualidade inicial, (Adaptado de Barth *et al.*, 2004).

Por outro lado, Kittur *et al.* (2001) referem que a utilização de procedimentos correctos de imersão dos produtos minimamente processados em quitosano, com acondicionamento em atmosfera modificada e posterior refrigeração, pode aumentar o tempo de vida útil destes produtos pois, diminuem a taxa respiratória e a perda de água, retardando a sua degradação e dando, assim, origem a produtos semelhantes aos frescos (Kittur *et al.*, 2001).

1.19. Parâmetros avaliados para os diferentes tratamentos aplicados a peras 'Rocha'

i) Colorimetria

O grau de maturação da pêra, assim como os processos oxidativos, que provocam o seu escurecimento, podem ser avaliados através do sistema colorimétrico CIELAB, sendo medidas as coordenadas colorimétricas cartesianas: L* (lightness – luminosidade; claridade), C (croma), e os eixos a* e b*. A luminosidade varia entre 0 (preto) e 100 (branco) e o croma traduz a saturação e intensidade da cor. A tonalidade (ângulo Hue) é mais definida quanto maior for o valor do croma e mais acinzentada quanto menor for o croma. É expressa em graus e corresponde a valores de a* e de b* positivos e negativos. A valores negativos de a* correspondem os tons esverdeados e a valores positivos de a*, a cor avermelhada. Quanto à coordenada b*, a valores negativos correspondem cores azuladas e a valores positivos, as cores amareladas (Figura 1.7) (Bible e Singha, 1993).

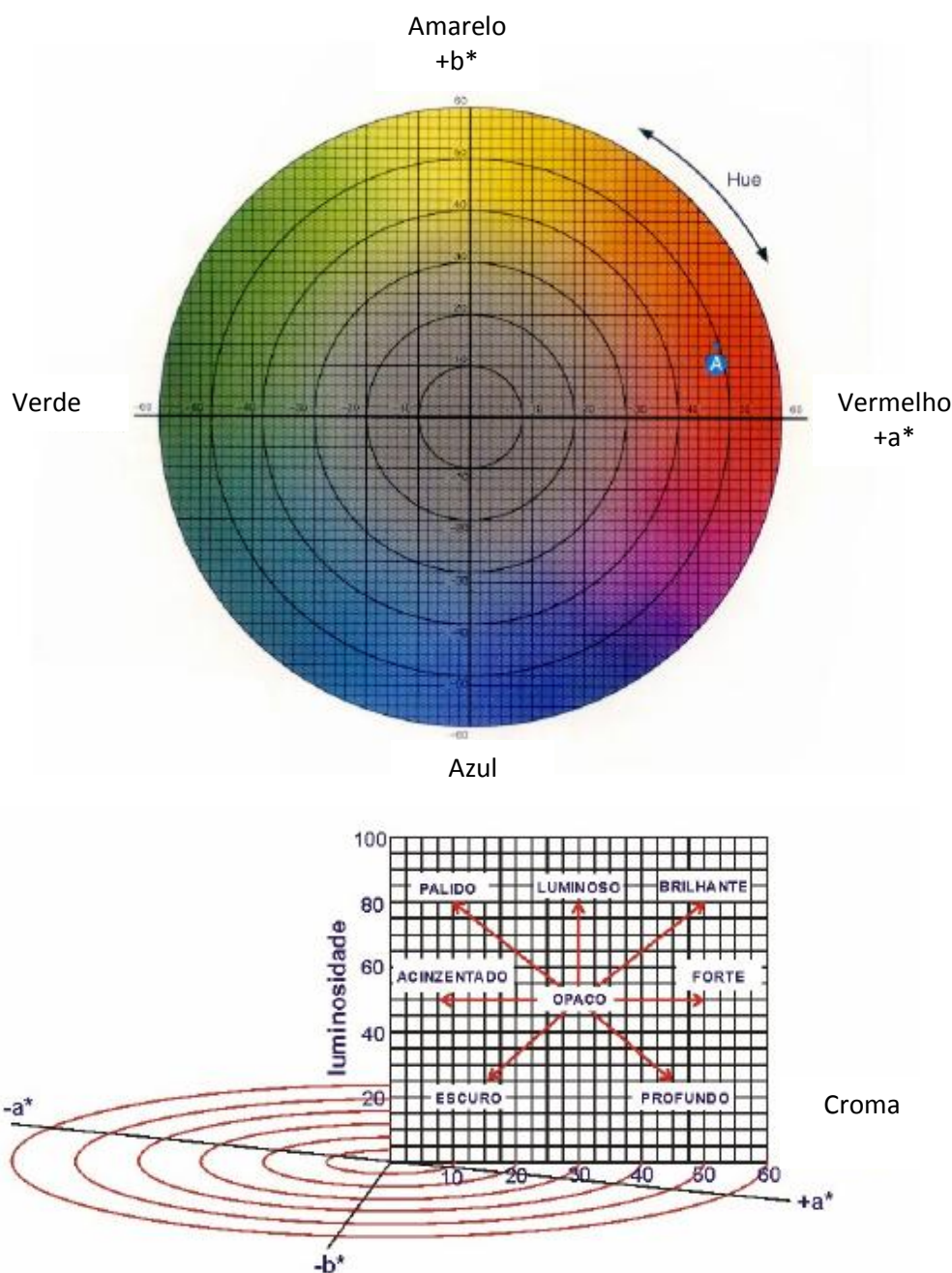


Figura 1.7 – Eixos dos valores de cromia a^* e b^* e de L^* (adaptado de Pilon, 2007).

ii) Índice refractométrico ou sólidos solúveis totais

É um parâmetro que avalia o teor de sólidos solúveis totais existentes no sumo de frutos, do qual fazem parte maioritariamente os açúcares. A média do teor calórico da pêra (de 5 variedades) é de 41kcal (=170kJ) por 100g de pêra, o que reflecte principalmente a variação de açúcares solúveis e de glícidos (INSA, 2007).

O IR depende, essencialmente, das condições climáticas do mês que antecede a colheita. Assim, quando as temperaturas são mais elevadas, as peras ficam com uma qualidade superior. O excesso de água, devido a chuva ou rega excessiva, deteriora a qualidade de pêra. Este índice permite

averiguar o estado de maturação da fruta e aferir a sua qualidade organoléptica. Permite ainda aferir a quantidade de açúcares presente da pêra, uma vez que 80% da matéria sólida solúvel desta é açúcares. Os sólidos solúveis totais ou resíduo seco expressam-se em °Brix (grau brix) ou gramas de sacarose por 100g de peso fresco e são aferidos com um refractómetro utilizando o sumo obtido por compressão de uma fracção da pêra (Soares *et al.*, 2001).

iii) Acidez titulável

A determinação da acidez baseia-se numa reacção ácido-base efectuada por titulação potenciométrica com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até um pH 8,2 e é expressa em gramas de ácido málico por L de sumo. Uma pêra 'Rocha' de boa qualidade possui uma acidez até aproximadamente 2,2g de ácido málico por litro de sumo. A qualidade da pêra é tanto maior quanto maior a quantidade de ácidos, de açúcares e respectivo quociente. O equilíbrio destes dois constituintes é responsável pela qualidade organoléptica da pêra. Ao longo do período de conservação no frio, o teor de ácidos vai diminuindo (Soares *et al.*, 2001).

iv) pH

O pH, ou potencial hidrogeniónico, indica o grau de acidez ou de alcalinidade de uma solução, avaliado por potenciometria. Os seus valores variam numa escala de 0 a 14, sendo o valor 7 (pH da água pura) correspondente à neutralidade. Abaixo deste valor a solução é ácida e acima é básica ou alcalina. O valor do pH dos alimentos está directamente relacionado com os iões livres de hidrogénio neles presentes. Este parâmetro depende da temperatura, por isso se convencionou referir o valor de pH medido à temperatura de 25°C. É um indicador de extrema importância, uma vez que depende dele, entre outras coisas, o maior ou menor desenvolvimento microbiano e consequentemente a deterioração do alimento. Desta forma, a pHs extremos, isto é, muito ácidos e/ ou muito alcalinos, há uma maior inibição do desenvolvimento microbiano. É necessário conhecer o pH de cada alimento para poder conservá-lo nas condições mais adequadas (McGlynn, 2001). A pêra é um fruto ácido, possuindo um pH que pode variar de 3,5 a 4,6 (FDA, 2007).

v) Humidade

A pêra possui cerca de 85% de água (INSA, 2007). O teor de humidade é um parâmetro muito importante porque a sua diminuição corresponde a uma perda de peso que induz o engelamento dos tecidos e se traduz numa perda financeira na venda dos frutos. A humidade de um alimento está relacionada com a sua estabilidade, qualidade e composição, e tem uma relação directa com a forma de armazenamento. No caso dos frutos, devido ao seu elevado teor de humidade, é necessário efectuar um armazenamento refrigerado, para impedir a desidratação dos tecidos.

De acordo com o teor de humidade, os produtos alimentares podem classificar-se como perecíveis, se o teor de água for muito elevado, como acontece nos frutos e hortícolas, e deteriorável, se o teor de água estiver compreendido entre 15 e 30% na época de colheita.

O método directo em estufa é o método mais utilizado para determinar o teor de humidade de alimentos e baseia-se na remoção da água por aquecimento, onde o ar quente é absorvido por uma camada muito fina do alimento e é então conduzido para o interior por condução. Como a condutividade térmica dos alimentos é normalmente baixa, o tempo até o calor atingir as porções mais internas do alimento é, em geral, um pouco longo. A evaporação é efectuada até se obter um peso constante (Park e Colato, 2006). O aquecimento da amostra em estufa para determinação da humidade, quando efectuado em condições incorrectas pode causar a caramelização ou decomposição dos açúcares, perda de voláteis ou ainda a oxidação dos lípidos.

vi) Dureza

A dureza ou firmeza de um fruto é uma característica muito importante do seu metabolismo e está directamente relacionada com a actividade de proteases e enzimas pectinolíticas. Verifica-se que há uma redução da dureza quando se dá a hidrólise progressiva das pectinas (Aquino, 2006). Para determinar a dureza da pêra inteira, pode utilizar-se um penetrómetro. A velocidade de operação e da leitura devem ser de 2 segundos para não afectar o resultado final e pode ser efectuada em dois ou três locais equidistantes da pêra onde previamente foi removida a epiderme (Soares *et al.*, 2001). Os valores adequados da dureza para efectuar a colheita são, para a pêra da variedade 'Rocha' de 5,5 a 6,5kg/0,5cm² (Herrero e Guardia, 1992). Para determinar a dureza de fatias de pêra, pode utilizar-se um texturómetro (Figura 1.8) que mede a força de compressão. Já o penetrómetro (dureza da pêra inteira) mede a força de resistência à pressão.



Figura 1.8 – Texturómetro.

vii) Glúcidos

A pêra possui uma textura macia que se deve, em parte, à hidrólise do amido, durante a maturação. Os glúcidos predominantes são a frutose, o sorbitol, a glucose e a sacarose. Quanto maior for a quantidade de amido formada durante o crescimento dos frutos, maior será a quantidade de glúcidos quando estes estiverem maduros. As peras podem apresentar mudanças consideráveis no conteúdo de açúcares totais, dependendo do período de exposição ao sol e ao calor, condicionantes importantes do processo fotossintético durante a maturação dos frutos na árvore. Depende também das alterações bioquímicas profundas que ocorrem durante o período entre a colheita e o ponto de amadurecimento que leva os frutos a tornarem-se comestíveis (Soares *et al.*, 2001).

viii) Ácido ascórbico

Uma pêra de 100g possui 3mg de vitamina C (INSA, 2007), o correspondente a 10% da dose diária recomendada (60mg diárias para um adulto, segundo a FDA (2007)). A vitamina C é essencial para o metabolismo normal e reparação dos tecidos, evitando danos provocados pelos radicais livres (subprodutos prejudiciais ao metabolismo). Melhora o sistema imunitário e promove a cicatrização. É um dos responsáveis pela actividade antioxidante das peras, bem como os compostos fenólicos (Almeida e Pintado, 2007).

É a mais instável das vitaminas uma vez que é sensível a determinados agentes físico-químicos como a luz, o oxigénio e o calor. Klein (1987) defendeu que esta perda de estabilidade se deve ao rompimento celular causado por danos nos tecidos do alimento, corte ou trituração.

O conteúdo de ácido ascórbico pode ser determinado por HPLC, com um detector UV/VIS, utilizando um comprimento de onda de 254 nm. No acondicionamento de frutos mediante aplicação de atmosfera modificada, um abaixamento dos teores de oxigénio promove a inibição da oxidação da vitamina C. Este processo é regulado, sobretudo, pela oxidase do ácido ascórbico e por outras enzimas com baixa afinidade para o oxigénio. Desta forma, em condições com baixos teores deste gás (O₂), ocorre um retardamento na conversão de ácido ascórbico em ácido desidroascórbico (Aquino, 2006).

ix) Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão naturalmente presentes nos frutos e vegetais e apresentam grupos hidroxilo e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímero, o que lhes confere poder antioxidante. Podem apresentar-se nas formas livre ou complexada com açúcares ou proteínas. Possuem uma estrutura variável e, por isso, são multifuncionais. Existem cerca de 5 mil fenóis, como os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis que se caracterizam por serem dos antioxidantes fenólicos de ocorrência natural mais comuns (Shahidi e Naczk, 1995).

O teor de compostos fenólicos depende de factores intrínsecos como o género, espécie e o tipo de cultivar do produto vegetal. Depende ainda de factores extrínsecos como as condições ambientais, a forma de cultivo e as condições de armazenamento (Barberan *et al.*, 2001).

Estes compostos, derivados da fenilalanina e da tirosina, encontram-se em numerosas plantas e são um grupo muito diversificado de fitoquímicos responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (Naczki e Shahidi, 2004). As principais fontes destes compostos são frutos cítricos, como limão, laranja e tangerina, e outros frutos como a cereja, uva, ameixa, maçã e pêra. Encontram-se em maiores quantidades na polpa que no sumo do fruto (Pimentel *et al.*, 2005).

Um dos métodos mais utilizados para efectuar a sua quantificação é o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, (Rossi e Singleton, 1965), utilizado neste trabalho.

Segundo Andrade *et al.* (1998), o perfil fenólico da pêra é constituído por, ácido 3-O-cafeoilquínico, (+)-catequina, ácido p-hidroxibenzóico, ácido 5-O-cafeoilquínico, (-)-epicatequina, 3-O-galactosilquercetina, 3-O-galactosilquercetina, 3-O-ramnosilquercetina e arbutina. O compostos 3-O-cafeoilquínico, corresponde a 8% do total de compostos fenólicos e o composto 5-O-cafeoilquínico é o que se encontra em maior quantidade.

As peras possuem uma actividade antioxidante moderada, embora seja superior à da maioria dos produtos hortofrutícolas. A contribuição das peras na ingestão de antioxidantes pode ser substancial nos países da Europa onde o consumo anual *per capita* pode chegar a 14kg, segundo dados da FAO (2007).

x) Análise Sensorial

A análise sensorial é a ciência que envolve todas as determinações relacionadas com os sentidos (visão, olfacto, paladar, tacto e audição) (Esteves, 2006).

A metodologia mais usual utilizada na avaliação da qualidade de um produto recorre à informação proveniente de um grupo de indivíduos designado por painel de provadores. A análise sensorial é efectuada em função das respostas transmitidas pelo painel e que resultam de vários estímulos e sensações provocadas pelo alimento e que originam reacções fisiológicas, resultando na interpretação das propriedades do alimento. Os estímulos são medidos por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos, e podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desaprovação relativamente ao produto em avaliação.

Existem vários testes sensoriais, mas no âmbito desta dissertação de mestrado, o que melhor se aplicou foi o teste de consumidor (teste subjectivo). Os testes subjectivos avaliam a opinião do consumidor de acordo com a sua preferência e/ ou aceitação de um produto. O teste de aceitação expressa a opinião do consumidor acerca das características específicas do produto. Nestes testes é utilizada uma escala hedónica que pode variar de 5 a 9 pontos que expressa o quanto o provador gostou ou não gostou da amostra em avaliação, avaliando assim a preferência do consumidor em respostas de “gosto” ou “não gosto”. Esta análise não requer treino, uma vez que expressa a opinião individual do consumidor. A escala deve possuir uma quantidade equilibrada de categorias, isto é,

possuir um ponto médio, utilizando o termo “indiferente” ou “nem gostei, nem desgostei”. As amostras são codificadas com números de 3 algarismos.

As provas devem ser realizadas em cabines de prova individuais para minimizar interferências externas, isto é, distrações e comunicação entre os provadores. Devem ser efectuadas em ambiente neutro, sossegado, isento de cheiros, longe de fontes de odores e ruídos e com iluminação apropriada. Estas devem ocorrer a meio da manhã ou a meio da tarde, evitando que o provador esteja cansado ou com fome (IAL, 2005; Queiroz e Treptow, 2006).

xi) Análises microbiológicas

Durante o processamento da pêra ‘Rocha’, as barreiras químicas e físicas que constituem a epiderme do fruto e que o protegem do desenvolvimento microbiano, são cortadas, devido ao fatiamento, ficando a polpa mais exposta, com conseqüente maior probabilidade de desenvolvimento microbiano (adaptado de Brecht, 1995). Os microrganismos mais propícios a contaminar as peras são bactérias como *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigela*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (bactérias patogénicas) e bactérias lácticas (não patogénicas). A presença dos patogénicos referidos, caso ocorra, deve-se à contaminação da matéria-prima por falta de higiene dos manipuladores ou devido a equipamentos contaminados. Os fungos mais frequentes na pêra são *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.* e *Botrytis sp.* e as leveduras que mais ocorrem neste fruto são *Saccharomyces sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Pichia sp.*, *Kloeckera sp.*, *Candida sp.* e *Rodhotorula sp.* (Aquino, 2006).

Segundo o regulamento (CE) Nº 2073/2005 da Comissão Europeia de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis a alimentos, “os géneros alimentícios não devem conter microrganismos nem as suas toxinas e metabolitos em quantidades que representem um risco aceitável para a saúde humana”. Para avaliar a qualidade microbiológica da pêra e de outros produtos alimentares, existem valores-guia que devem ser cumpridos, isto é, valores que servem para identificar situações que requerem monitorização. Estes valores existem porque a lei portuguesa é omissa no que se refere à grande maioria dos produtos prontos a consumir. Assim, os valores-guia no que se refere aos mesófilos (bactérias que crescem rapidamente em meio aeróbio, a temperaturas entre 20°C e 50°C), são considerados satisfatórios se o número de UFC/g for inferior ou igual a 10^4 , aceitável se for maior que 10^4 e menor ou igual a 10^6 e não satisfatório se for superior a 10^6 . Relativamente aos fungos, os valores de UFC/g são considerados satisfatórios se forem inferiores ou iguais a 10^2 , aceitáveis caso sejam superiores a 10^2 e iguais ou inferiores a 10^3 . Quanto às leveduras, os valores de UFC/g são considerados satisfatórios se forem inferiores ou iguais a 10^2 , aceitáveis caso sejam superiores a 10^2 e iguais ou inferiores a 10^5 UFC/g. Os valores-guia referidos anteriormente foram elaborados pelos laboratórios do INSA devido às dificuldades encontradas para uma correcta avaliação da qualidade microbiológica das amostras, provocadas pela lacuna existente na legislação. Quanto aos psicrófilos (microrganismos que crescem satisfatoriamente a temperaturas abaixo de 20°C), não estão aferidos valores-guia para este grupo de microrganismos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

Foram estudadas peras da variedade 'Rocha'. Os frutos foram cedidos pela empresa fruteira "Frutus", localizada na Sobrena, Concelho do Cadaval e foram colhidos, no estado de maturação comercial, na região Oeste portuguesa, na campanha de 2010, tendo sido armazenados em câmaras de refrigeração a 4-5°C com atmosfera controlada até Março de 2011. Os frutos foram divididos em 3 lotes.

2.2. Quitosano

O quitosano utilizado era de origem animal (exosqueleto de crustáceos) e possuía cerca de 75-77% de desacetilação. Na sua composição estava presente 1% de ácido acético e a sua viscosidade era de 200-800cps. O quitosano adquirido (*Sigma Aldrich*; Ref.448877) era de peso molecular médio (MMW – *médium molecular weight*), o que possibilitava uma maior tendência para formar géis e filmes, comparativamente ao de peso molecular baixo (LMW – *low molecular weight*).

2.3. Ensaios prévios de solubilidade do quitosano

2.3.1. Solubilidade do quitosano em ácido acético 0,5% e em ácido ascórbico 0,5%

Prepararam-se soluções aquosas de 50mL de ácido acético 0,5% (v/v) (Fluka) e de ácido ascórbico 0,5% (v/v) (Fluka) com quitosano (com 75-77% de desacetilação, de peso molecular médio) (Sigma) com concentrações de 0,7; 1; 1,5 e 2 g/L. Determinou-se o pH de cada uma das soluções e procedeu-se ao ajuste com NaOH (Merck) até pH de 3,5. Separaram-se as soluções de quitosano de cada concentração para 2 balões volumétricos de 25mL e colocou-se um à temperatura ambiente e outro a 4°C durante alguns dias. Repetiram-se as leituras de pH com um potenciómetro *Jenway* e verificou-se a estabilidade das mesmas, mediante avaliação da ocorrência/ não ocorrência de precipitação.

2.4. Preparação das peras 'Rocha' e imersão em soluções de quitosano

O processo tecnológico de elaboração da pêra 'Rocha' minimamente processada, com aplicação de biofilmes e acondicionamento em atmosfera modificada pode ser descrito de acordo com o representado na Figura 2.1.

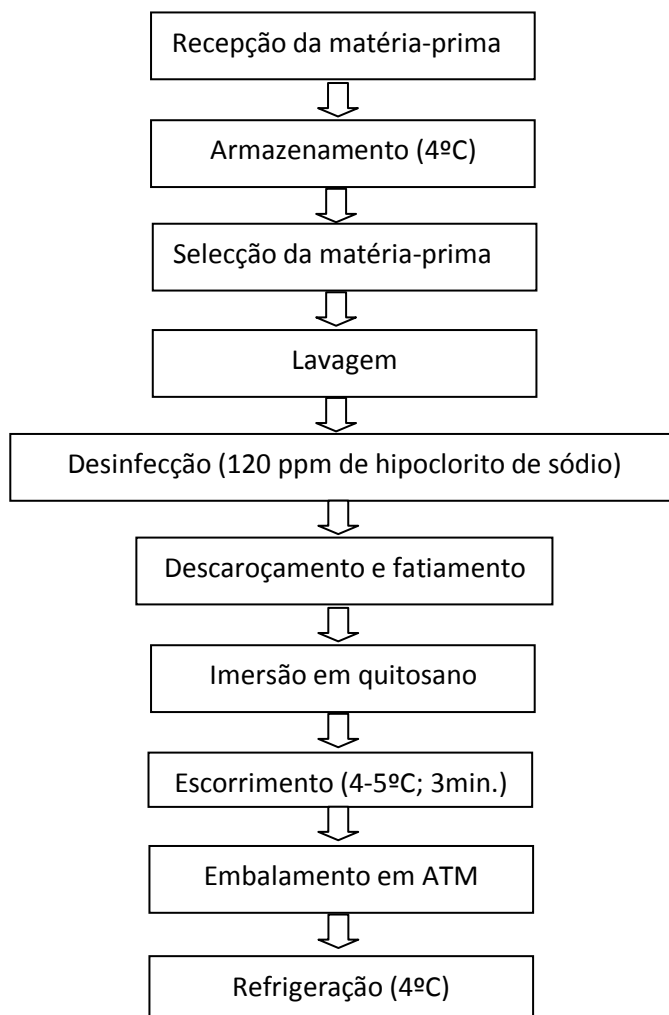


Figura 2.1 – Processamento da pêra 'Rocha' minimamente processada.

Desinfecção e fatiamento

Procedeu-se à desinfecção das peras 'Rocha' inteiras com uma solução de hipoclorito de sódio 0,3%. Lavaram-se e cortaram-se manualmente as amostras de pêra Rocha em fatias, com auxílio de facas de aço inoxidável de lâmina fina.

Imersão em soluções de quitosano

Após o fatiamento, procedeu-se imediatamente à imersão das fatias de pêra 'Rocha' em soluções de quitosano de concentrações 0,7, 1, 1,5 e 2g/L, dissolvido em ácido ascórbico 0,5%, a pH 6. As amostras permaneceram em imersão durante 1 minuto. Efectuou-se o escorrimento das peras ao ar, a 4°C, durante 3 minutos. Para os ensaios em atmosfera normal, acondicionaram-se as fatias de pêra em caixas de Petri (3 fatias/caixa) e para os ensaios de atmosfera modificada colocaram-se 16 fatias (equivalente a uma pêra) em embalagens com atmosfera modificada (CO₂ entre 12 e 18%; O₂ entre 3 e 8%; restante é N₂ (70 a 80%)), aplicando as condições descritas na tabela 2.1. Efectuaram-se também três controlos, um sem qualquer tratamento e outro em que as fatias foram imersas em ácido ascórbico 0,5% e outro em que foram imersas em água.

Tabela 2.1 – Tratamentos efectuados com indicação das diferentes concentrações da solução de quitosano e tipos de atmosfera.

Tratamentos	Concentração (g/L)	Atmosfera
1	0,7	Ambiente
2		Modificada
3	1,0	Ambiente
4		Modificada
5	1,5	Ambiente
6		Modificada
7	2,0	Ambiente
8		Modificada

2.5. Avaliação da cor

As medições de colorimetria foram realizadas com um colorímetro (*Minolta* CR-300 chromameter, Data Processor 301). Procedeu-se à calibração do aparelho com o padrão, que consiste numa placa branca de cerâmica (Y=93,1; x=0,3161; y=0,3326). Aproximou-se o sensor à epiderme do fruto na zona equatorial, em três zonas equidistantes, evitando as zonas com defeitos, podridões ou outras falhas. Efectuou-se a leitura de cada uma dessas zonas, obtendo valores das coordenadas colorimétricas L*, a* e b*.

Para avaliar a cor da polpa, aproximou-se o sensor em três zonas equidistantes da mesma e efectuou-se a leitura de cada zona.

2.6. Avaliação do teor de humidade (adaptado de AOAC, 1990)

Numa balança analítica (Monobloc Inside AB 204S), pesou-se numa caixa de Petri, previamente seca em estufa e tarada, 5 fatias de pêra 'Rocha'. Determinou-se o teor de humidade da pêra através do método directo, por remoção da água por aquecimento em estufa a 45°C, até a amostra ter atingido peso constante. O peso das amostras foi registado 48h e 72h depois das amostras terem sido colocadas na estufa (WTB binder). Calculou-se a diferença de peso das amostras no início e no fim do processo e multiplicou-se por 100 para obter o resultado em percentagem, através da seguinte fórmula:

$$\%H = ((P_1 - P_2) / (P_1 - P_3)) * 100$$

em que:

H é a humidade (%);

P1 é o peso da amostra juntamente com a caixa de Petri (g);

P2 é o peso da amostra seca juntamente com a caixa de Petri (g);

P3 é a tara da caixa de Petri (g).

2.7. Avaliação dos sólidos solúveis totais ou índice refractométrico

Comprimiu-se uma fracção de pêra 'Rocha' até obter sumo suficiente. Colocou-se o sumo na zona de leitura do refractómetro (Atago ATC-1E) e fechou-se a patilha. Efectuou-se a leitura do °Brix através da escala do monóculo do refractómetro.

2.8. Avaliação da dureza

2.8.1. Avaliação da dureza do fruto inteiro

Removeu-se parte da epiderme da pêra Rocha em três zonas equatoriais equidistantes da mesma. Colocou-se o fruto no penetrómetro (Penefel) e puxou-se a alavanca de forma a fazer penetrar o êmbolo na polpa da pêra. Efectuou-se a leitura da dureza.

2.8.2. Avaliação da dureza das fatias de pêra

As fatias de pêra foram colocadas no texturómetro (Texture Analyser TA-HDI, Stable Microsystems), sendo perfuradas com uma sonda de 3 mm de diâmetro a uma velocidade de 1,7 mm/s. A célula de carga utilizada foi de 50kg (a mais baixa, sendo a maior neste texturómetro a de 250 kg). Os resultados foram obtidos informaticamente através do software *Texture Expert*.

2.9. Avaliação da acidez titulável e do pH (IDF, 1981)

Triturou-se a polpa das peras 'Rocha'. Procedeu-se à filtração do sumo com bomba de vácuo (Neuberg Motortyp MW 63/4 IP 44), utilizando um filtro *Whatman 42*. Diluíram-se 20mL da amostra do sumo obtido em 20mL de água destilada (por duplicado). Em agitação num agitador *Agimatic-N P Selecta*, à temperatura ambiente, mediu-se o pH inicial da amostra diluída com o potenciómetro (Hanna instruments, Jenway 350 pH meter). Titulou-se a amostra do sumo (titulado) com uma solução de NaOH 0,1N (titulante) (Merck), adicionando gota a gota com um dispensador automático (Top buret H eppendorf) até o pH ter atingido e persistido aproximadamente 10 segundos no valor de 8,2, mantendo sempre a agitação.

Calculou-se a acidez titulável através da fórmula:

$$AT = V \times f$$

Onde:

AT é a acidez titulável (g ácido málico/L sumo);

V é o volume de solução de hidróxido de sódio 0,1N gasto na titulação, em mL;

f é o factor de correcção da solução de hidróxido de sódio 0,1N (f = 0,67).

2.10. Determinação do teor de glícidos

Extracção dos glícidos

Colocaram-se 70mL de água desionizada fria num copo de varinha mágica (Braun minipimer 3 MR 300 Cury) mantendo-o num recipiente de esferovite com gelo. Cortaram-se longitudinalmente 20g de polpa de pêra e foram de imediato colocados em gelo. Procedeu-se à homogeneização da amostra com o auxílio da varinha mágica e completou-se o volume com água desionizada fria até aos 100mL. Centrifugaram-se 35ml da amostra numa centrífuga *Biofuge 28 RS*, a 15000xg, 15 minutos a 4°C. Retirou-se o sobrenadante para um balão volumétrico e filtrou-se com uma seringa e filtro *Millipore* de 0,45µm de nylon (Millex-HN) para um tubo *eppendorf* (adaptado de Hudina e Stampar, 2000). As amostras ficaram conservadas a -20°C até posterior análise por HPLC (Waters binary HPLC).

Identificação e quantificação

Para a construção da curva de calibração, preparou-se uma solução padrão com sacarose (Sigma), glucose (Merck), frutose (Merck) e sorbitol (Sigma), e fizeram-se 7 diluições da mesma. Procedeu-se à injeção (30µL) dos padrões num HPLC equipado com um detector (Waters 2414), com coluna de fase reversa *Sugar-Pak I* (300x6,5mm; Waters) em forno a 90°C. O eluente (fase móvel) utilizado foi água pura com 50ppm de EDTA-Ca com um fluxo de 0,5mL/min. Para a análise das diferentes amostras, transferiu-se 1mL para os *vials*, estes foram colocados num porta-amostras, e

posteriormente foram injectados 30µL dos mesmos. O eluente (fase móvel) utilizado foi água. Os dados foram obtidos e analisados com o software *Breeze* (Pais *et al*, 2008).

2.11. Análise dos compostos fenólicos

Elaboração da curva padrão

Prepararam-se soluções de ácido gálico (Fluka) de diferentes concentrações: 50, 100, 150, 250 e 500mg/L (Tabela 1.3). Deixou-se reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac) e procedeu-se à leitura da absorvância destas soluções num espectrofotómetro (UV – visible recording spectrophotometer UV-160A Shimadzu) a um comprimento de onda de 760nm. Elaborou-se a curva padrão com o programa Microsoft Excel®, obtendo uma equação da recta.

Tabela 2.2 – Dados para elaboração da curva padrão com ácido gálico.

[Ácido gálico] (mg/L)	Volume de solução-mãe (µL)	Volume de água destilada (µL)	Volume total da solução (µL)
500			500
400	400	100	500
300	300	200	500
200	200	300	500
150	150	350	500
100	100	400	500
50	50	450	500
10	10	490	500

Preparação das amostras e extracção dos compostos fenólicos

Colocou-se 2g de pêra 'Rocha' com casca num almofariz e macerou-se, adicionando 20mL de uma solução de acetona 80% (Absolve), à temperatura ambiente. Colocou-se o preparado em copos de precipitação de 50mL que foram colocados num banho de ultra-sons (Sonorex RK 31 Badelin Electronic) durante 15 minutos. Centrifugaram-se as amostras numa centrífuga *Biofuge 28RS* (Heraeus Sepatech) a 1000xg, 10 minutos a 5°C e retirou-se o sobrenadante.

Medição dos compostos fenólicos

Colocou-se em tubos de *falcon* de 15mL, 2,5mL de água desionizada e 0,1mL de uma diluição conhecida do extracto (sobrenadante obtido anteriormente). Adicionou-se 0,5mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* à solução e deixou-se reagir durante 5 minutos. Colocou-se 1,5mL de carbonato de

sódio 20% (Solvay) no tubo e perpez-se o volume com água desionizada até 10mL. Esperou-se 2 horas, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Procedeu-se também à elaboração do 'branco', contendo tudo o que foi referido anteriormente à excepção do extracto. Colocou-se a solução em *cuvettes* e efectuou-se a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 760nm. Compararam-se as medições com as obtidas na equação da recta da curva padrão. Obteve-se os valores da concentração dos compostos fenólicos, exprimindo os resultados em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas +/- desvio padrão do peso fresco de pêra 'Rocha' (adaptado de Vieira *et al.*, 2009).

2.12. Determinação do teor de ácido ascórbico

Preparação das amostras de pêra 'Rocha'

Pesou-se 20g de polpa de pêra e homogeneizou-se com 30mL de ácido metafosfórico a 6% (Sigma). Centrifugou-se a suspensão numa centrífuga *Biofuge 28RS* (Heraeus Sepatech), a 15000xg, durante 20 minutos a 4°C. Após filtração num funil de *Büchner* com um filtro de *Whatman* nº 42, filtrou-se de novo com um filtro '*Milipore*' de 0,45µm e colocou-se 1,5mL do filtrado num tubo *eppendorf* e congelou-se num congelador (Heraeus Hera) *freeze* a -80°C. Fizeram-se replicados.

HPLC

As amostras foram analisadas por HPLC, utilizando um cromatógrafo *Beckman* equipado com um sistema de solventes (bombas) modelo 126, um detector de fotodíodos, modelo 168 (detector de absorvância no UV/VIS, $\lambda=254\text{nm}$), uma coluna *Spherisorb ODS-2*, da *Waters* (250 x 4,6 mm), 5µm, à temperatura ambiente. Utilizou-se um eluente (fase móvel) acidificado a pH 2,3 com ácido sulfúrico (95-97%), 280µL/L água, com um fluxo de 0,4mL/min isocrático, à temperatura ambiente e um volume de injeção da amostra de 20µL. Cada corrida demorou 13 minutos e os dados foram obtidos e analisados com o software *Karat 32*, versão 8.0. A identificação do ácido ascórbico foi efectuada com um padrão de concentração conhecida de ácido ascórbico, usado para quantificação da área dos picos nos cromatogramas.

2.13. Análises microbiológicas

Preparação dos meios de cultura e soluções

Meio de cultura PCA

Para preparar 1L de PCA, juntou-se 5g de triptona (Difco), 2,5g de extracto de levedura (Difco), 1g de glucose (Merck) e 15g de agár (Sigma). Juntou-se tudo num copo de precipitação, colocando-o numa placa de agitação/aquecimento (Agimatic-N P Selecta) com um agitador magnético e levou-se à



ebulição até dissolução. Deixou-se arrefecer e ajustou-se o pH a 7 com NaOH (Merck). Colocou-se em frascos de *schott* (Duran) e esterilizou-se na autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Meio de cultura PDA

Pesou-se 39g do meio PDA preparado (Biokar), colocou-se num copo de precipitação de 3000mL e juntou-se 1L de água destilada. Colocou-se o copo de precipitação com um magnete sobre uma placa de agitação (Agimatic-N P Selecta) até dissolução. Deixou-se arrefecer e adicionou-se 14mL de ácido tartárico 10% para ajustar o pH a 3,5.

Água de peptona 0,1%

Juntou-se num copo de precipitação, 0,45g de peptona (Merck) e 450mL de água destilada. Ajustou-se o pH a 7 com NaOH ou a pH 3,5 com HCL. Ajustou-se o volume final a 500mL.

Ácido tartárico 10%

Pesou-se 10g de ácido tartárico (Merck) e dissolveu-se em 100mL de água destilada.

Preparação das amostras

Pesou-se 10g de pêssego 'Rocha' de cada uma das modalidades. Triturou-se com uma varinha mágica (Braun minipimer 3 MR 300 Cury), adicionando 90mL de água destilada. O sumo obtido foi colocado em garrafas de 100mL devidamente identificadas e mantido a 4°C.

Preparação das soluções a inocular

▪ Para crescimento de fungos e leveduras

Numa câmara de fluxo laminar (Mini 2, Kotterman, Ehret DIN 40050), em condições estéreis, colocaram-se 9mL de água de peptona 0,1% (Merck) de pH 3,5 em tubos de *falcon* e juntou-se 1mL de sumo num dos tubos, obtendo-se uma diluição de 10^{-2} . Deste tubo retirou-se 1mL para outro tubo, obtendo-se uma concentração de 10^{-3} . Por fim, deste tubo retirou-se 1mL para outro, obtendo-se uma concentração de 10^{-4} .

▪ Para crescimento de mesófilos e psicrófilos

Nas condições referidas anteriormente, foram colocados em tubos de *falcon*, 9mL de água de peptona 0,1% (Merck) de pH 7 e juntou-se 1mL de sumo, obtendo-se uma concentração de 10^{-2} . Deste tubo retirou-se 1mL para outro tubo, obtendo-se uma concentração de 10^{-3} . Por fim, deste tubo retirou-se 1mL para outro, obtendo-se uma concentração de 10^{-4} .

Inoculação

Utilizando 1mL das soluções obtidas foram inoculadas placas de Petri com meios de cultura PDA, para crescimento de fungos e leveduras, a 25°C, e PCA para crescimento de mesófilos, a 30°C, e psicrófilos, a 4-5°C.

Contagem do número de UFC

Efectuaram-se as contagens do número de unidades formadoras de colónias após 24h de incubação para os mesófilos, 72h para os fungos e leveduras e após 10 dias para os psicrófilos. Os resultados foram expressos em (UFC/mL) (Atlas, 1993).

As análises microbiológicas nas peras acondicionadas em atmosfera normal foram efectuadas após 10 dias do início da experiência. Nas peras acondicionadas com atmosfera modificada, as análises foram efectuadas 10 e 16 dias após o início da experiência.

2.14. Análises sensoriais

Para a análise sensorial utilizou-se um painel de provadores não treinado constituído por 16 provadores. As amostras de pêra 'Rocha' colocaram-se num prato de plástico rectangular (3 Fatias/prato), e foram identificadas com códigos de três dígitos. Registou-se o tratamento que foi aplicado às amostras correspondentes aos diferentes códigos. Distribuíram-se os pratos com as amostras pelos provadores do painel, bem como um copo de água, uma bolacha de água e sal, um guardanapo, a folha de prova (em anexo) e uma esferográfica. Efectuaram-se as provas a meio da manhã.

2.15. Estatística

Aplicou-se o teste ANOVA ($P \leq 0,05$) para avaliação de diferenças nos resultados. Nos resultados obtidos com este teste, aplicou-se o teste de Tukey para comparação de médias (considerando um intervalo de confiança de 95%). Letras diferentes indicam diferenças significativas para um grau de confiança de 95%.

Para estudo da análise sensorial procedeu-se à aplicação de uma análise multivariada com o programa *Statistica* 6.0 (Software Copyright Statsoft Inc.).

3. Resultados e discussão

Devido às mudanças que ocorrem nas peras durante o amadurecimento, e pelo facto de se tratar de frutos de diferente data de colheita ou diferentes produtores, realizou-se no início dos ensaios a caracterização detalhada dos lotes de trabalho. Na Tabela 3.1 encontra-se descrita a caracterização dos 3 lotes de peras ‘Rocha’ utilizados nas experiências efectuadas.

Tabela 3.1 – Caracterização dos lotes 1, 2 e 3 de peras utilizados nos ensaios.

Parâmetros	Lote 1 ¹	Lote 2 ²	Lote 3 ³
Calibre	60-65	45-50	45-50
Colorimetria da epiderme	L = 72,7 a = 6,9 b = 42,6	L = 69,7 a = -6,5 b = 42,2	L = 72,4 a = -4,8 b = 42,7
Dureza do fruto (kg/cm ²)	5,4/0,5	5,5/0,5	5,1/0,5
Dureza das fatias (g)	988	978	873
SST (°Brix)	12,8	11,3	11,1
Acidez titulável (g ác. málico/L sumo)	2,98	3,07	1,8
pH	4,7	4,7	4,6
Humidade (%)	83	85	85
Compostos fenólicos (gEAG/100g)	60,2	63,32	66,32
Açúcares (g/100gPF)	Sacarose=0,81 Glucose=1,16 Frutose=4,96 Sorbitol=1,93	Sacarose=0,50 Glucose=1,11 Frutose=5,07 Sorbitol=1,59	Sacarose=0,62 Glucose=1,17 Frutose=4,97 Sorbitol=1,59
Vitamina C (µg/mL)	0,6	0,75	1,03

* O lote1 foi utilizado no primeiro ensaio de imersão das peras sem acondicionamento em ATM.

*² O lote 2 foi utilizado no segundo ensaio de imersão sem ATM e no primeiro e segundo ensaio com ATM.

*³ O lote 3 foi utilizado nas análises microbiológicas da experiência com e sem ATM e nas análises sensoriais com e sem ATM.

3.1. Colorimetria

3.1.1. Análise colorimétrica de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano não acondicionadas em atmosfera modificada

Após aplicação do teste ANOVA, relativamente ao L^* (Figura 3.1), verifica-se que no tempo zero as modalidades 'sem tratamentos', 'imerso em água', '0,7g/L', '1,5g/L' e '2g/L' não apresentam diferenças. Já as modalidades '0g/L' e '1g/L' apresentam diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$).

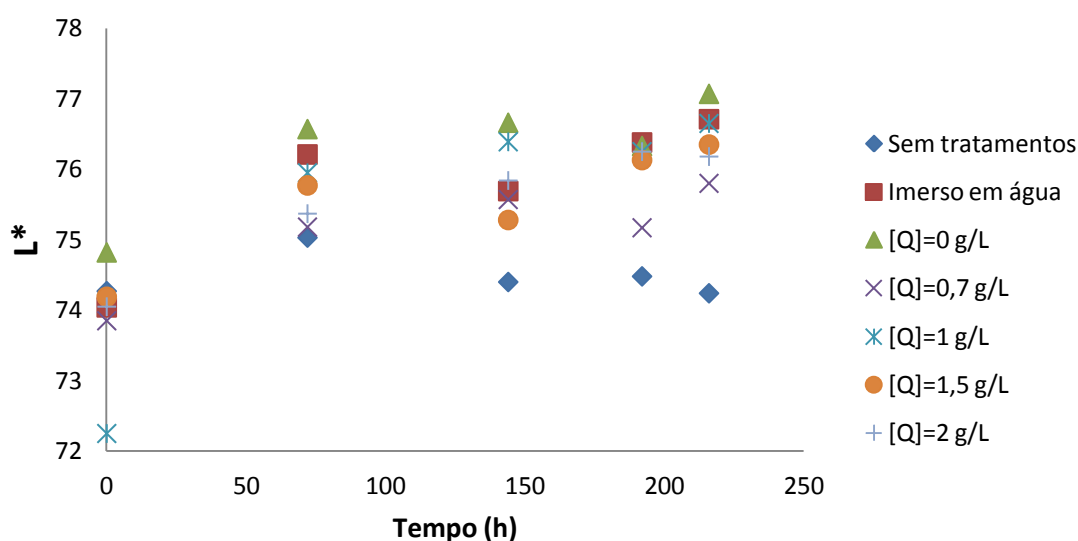


Figura 3.1 – Variação da luminosidade ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e correspondentes controles.

Passadas 144h, só a modalidade 'sem tratamentos' se diferencia das restantes modalidades ($P \leq 0,05$). No último momento registado, 216h depois do fatiamento, observa-se uma diminuição significativa do valor de L^* para a modalidade 'sem tratamentos' comparada com as modalidades 'imerso em água' e '0g/L' ($P \leq 0,05$). No entanto, ao longo do ensaio verifica-se que não existem diferenças significativas entre as modalidades com quitosano, o que não permite estabelecer uma relação entre os distintos tratamentos efectuados e esta coordenada colorimétrica. Comparando os resultados obtidos para a coordenada L^* , com as figuras de Pilon (2007), podem classificar-se os tons das fatias de peras com a designação 'pálido'. Cabe destacar que, de uma forma geral, ao longo do tempo, ocorre um aumento da luminosidade do tempo zero até às 216h em todas as modalidades, excepto na modalidade 'sem tratamentos', concordando assim com o escurecimento destas fatias.

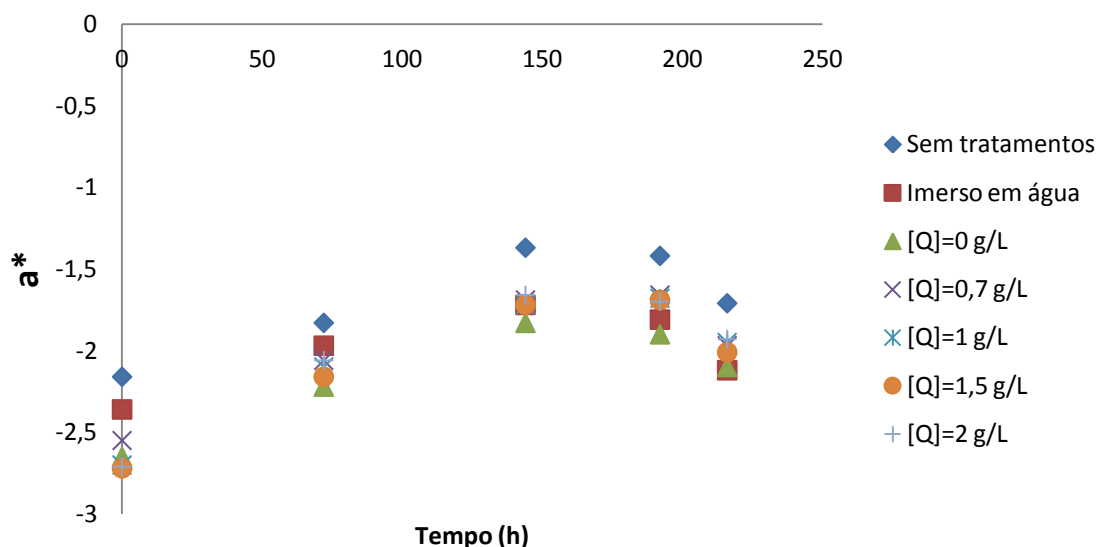


Figura 3.2 – Variação da coordenada colorimétrica a^* ao longo do tempo em fatias de pêra ‘Rocha’ tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controles.

Na coordenada colorimétrica a^* (Figura 3.2), em fatias de pêra ‘Rocha’ não acondicionadas em ATM, verificou-se um comportamento muito semelhante para todas as modalidades. Ao longo do tempo, não foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$), excepto para a modalidade ‘sem tratamentos’, na qual se observou um ligeiro aumento do valor de a^* . Os resultados obtidos sugerem que, nas condições estudadas, não existe uma relação entre os tratamentos aplicados e esta coordenada colorimétrica.

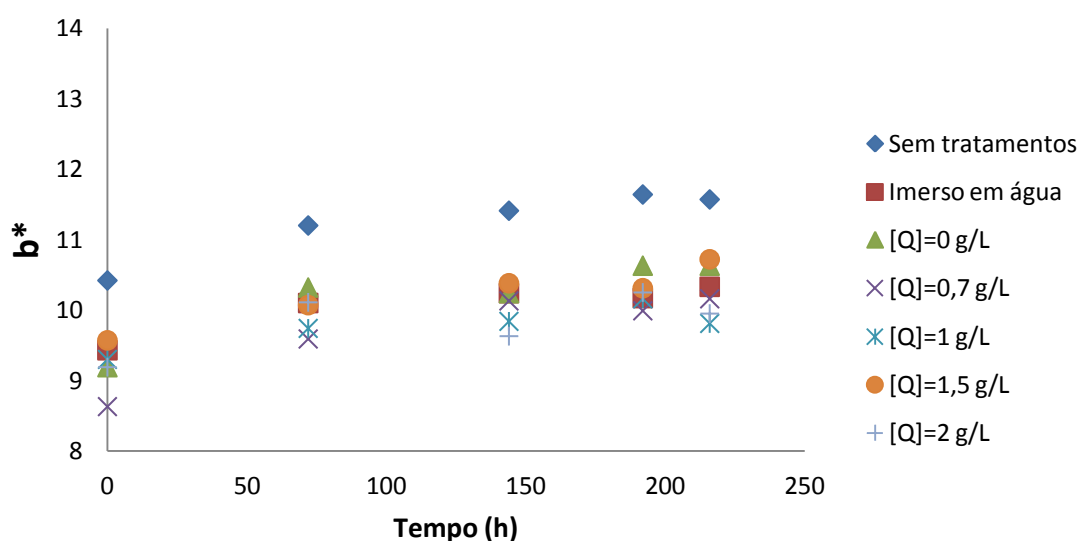


Figura 3.3 – Variação da coordenada colorimétrica b^* ao longo do tempo em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controles.

Quanto à coordenada colorimétrica b^* (Figura 3.3), os resultados mostraram uma tendência semelhante à observada para a coordenada a^* . Ao longo de todo o ensaio não se obtiveram diferenças significativas nas diferentes concentrações de quitosano entre si, nem entre estas e os controlos. A modalidade ‘sem tratamentos’ foi a única com valores de b^* significativamente diferentes dos restantes ($P \leq 0,05$).

Os resultados obtidos indicam que não é possível estabelecer uma relação entre os tratamentos efectuados e esta coordenada colorimétrica.

3.1.2. Análise colorimétrica de fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano acondicionadas em atmosfera modificada

De uma forma geral, verifica-se que na maior parte dos registos efectuados (Figura 3.4), as concentrações de 1g/L e de 1,5g/L apresentam valores de luminosidade superiores aos das restantes modalidades, embora as diferenças sejam mínimas.

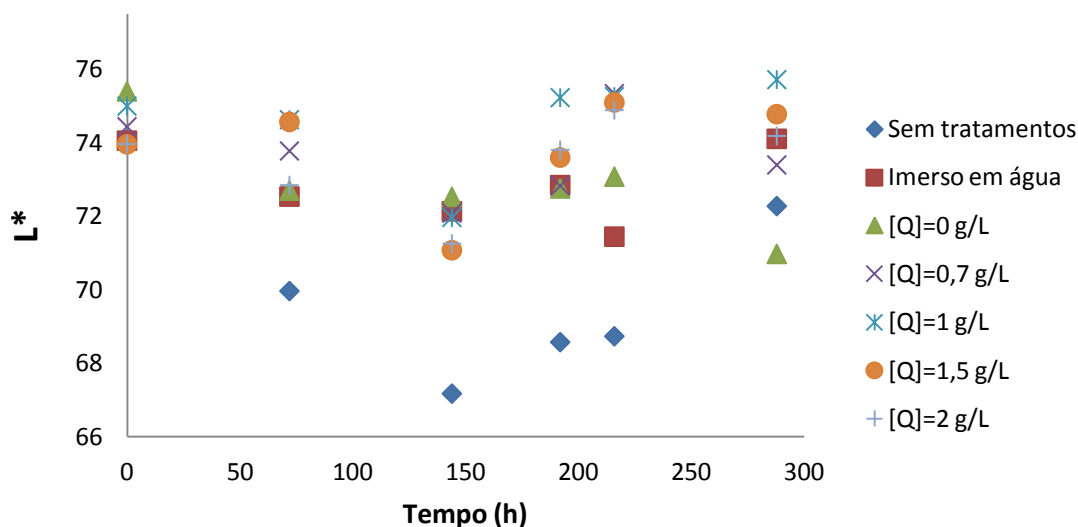


Figura 3.4 – Variação da luminosidade ao longo do tempo em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.

Verifica-se ainda que os valores de todas as modalidades à excepção da ‘sem tratamentos’ variam entre 70 e 76, enquanto os valores desta modalidade (sem tratamentos) são significativamente diferentes e estão todos abaixo de 70.

É importante destacar que, passadas 288h se observa que as fatias tratadas com ‘1g/L’ de quitosano apresentam diferenças significativas em relação às modalidades ‘sem tratamentos’, ‘imerso em água’ e ‘0g/L’.

Os tratamentos possuem um efeito antioxidante, embora não seja possível verificar grandes diferenças nas diversas concentrações de quitosano aplicadas às fatias de pêra ‘Rocha’.

Comparando os ensaios sem e com atmosfera modificada, observa-se que, embora os valores iniciais de luminosidade sejam muito semelhantes para ambos os ensaios, a evolução ao longo do tempo é diferente, alcançando no primeiro ensaio valores superiores de luminosidade (valores entre 75 e 77, Figura 3.1).

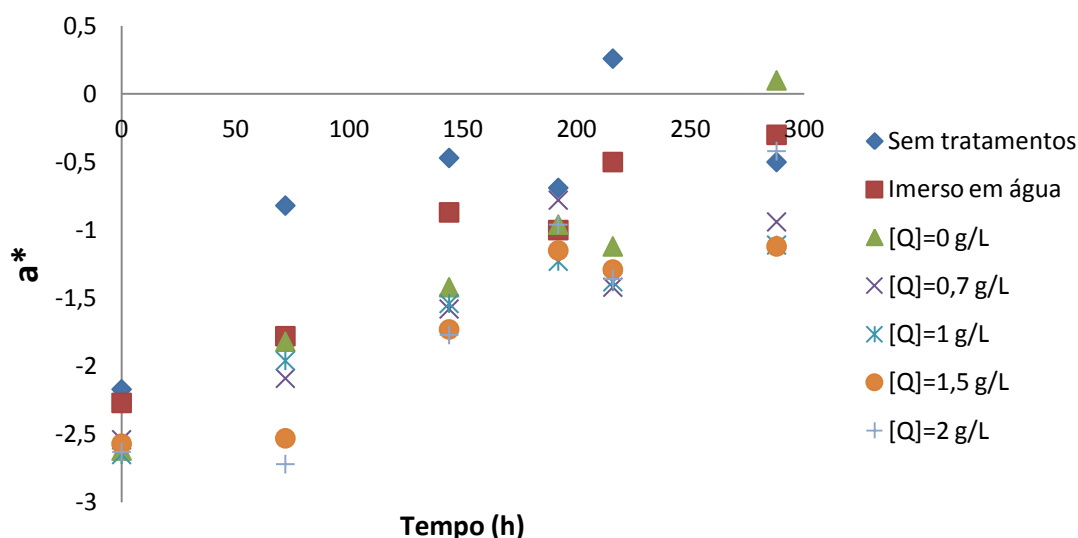


Figura 3.5 – Variação da coordenada colorimétrica a^* ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controles.

No tempo zero, a coordenada colorimétrica a^* (Figura 3.5) não apresenta diferenças significativas em qualquer um dos tratamentos efectuados ($P \leq 0,05$). Passadas 72h, verifica-se que a modalidade '2g/L' apresenta diferenças significativas com as modalidades 'sem tratamentos', 'imerso em água' e '0g/L' (modalidades sem quitosano), embora não possua diferenças significativas entre as restantes modalidades com quitosano ('0,7g/L', '1g/L', '1,5g/L') ($P \leq 0,05$). Após 216h do fatiamento, verifica-se que todas as modalidades com quitosano ('0,7g/L', '1g/L', '1,5g/L' e '2g/L') não possuem diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). Observa-se também que a modalidade 'sem tratamentos' apresenta diferenças significativas das restantes modalidades ($P \leq 0,05$), sendo o valor de a^* superior e positivo. Às 288h, verifica-se que as modalidades '1g/L' e '1,5g/L' não apresentam diferenças significativas entre si, mas apresentam diferenças significativas das modalidades 'imerso em água', '0g/L', '0,7g/L', '1g/L' e '1,5g/L'.

De uma forma geral, relativamente à variável a^* , observa-se que nas modalidades 'sem tratamentos' e 'imerso em água', os valores são superiores, permanecendo os restantes muito próximos entre si. Observa-se que ao longo do tempo ocorre um ligeiro aumento desta coordenada colorimétrica, correspondendo a uma passagem para os tons acastanhados.

É de salientar que, embora as diferenças não sejam muito marcadas, os valores de a^* correspondentes às modalidades '0,7g/L', '1g/L' e '1,5g/L', mantêm-se sempre mais baixos que os restantes, evidenciando o efeito antioxidante do quitosano.

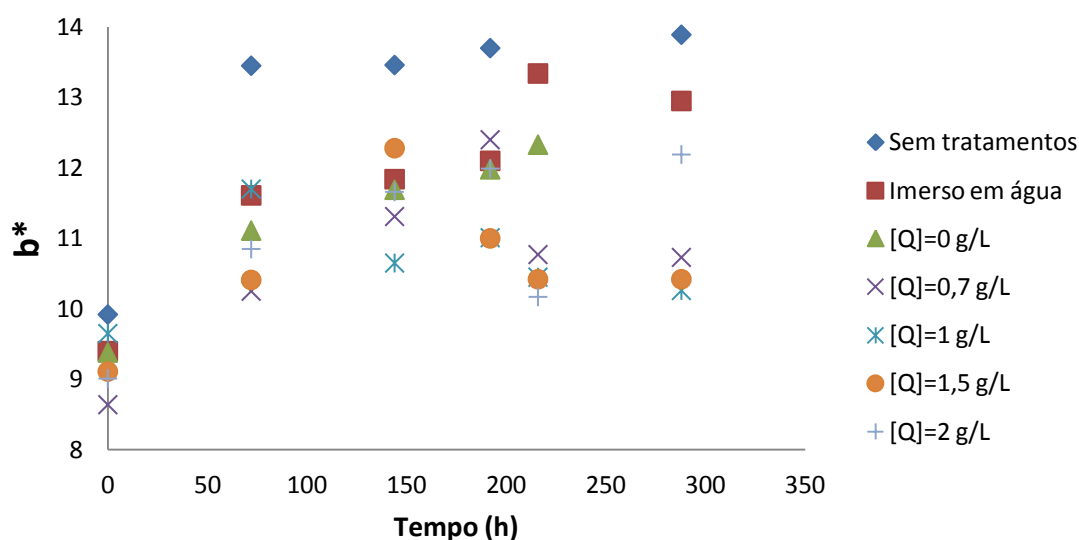


Figura 3.6 – Variação da coordenada colorimétrica b^* ao longo do tempo em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.

Relativamente à coordenada colorimétrica b^* (Figura 3.6), verifica-se que no tempo zero não existem diferenças significativas entre as diversas modalidades. Em geral, esta tendência mantém-se ao longo do tempo, excepto na modalidade 'sem tratamentos'. Às 192h, as modalidades '1g/L' e '1,5g/L' começam a diferenciar-se das restantes, apresentando diferenças significativas da modalidade 'sem tratamentos' ($P \leq 0,05$). Esta tendência mantém-se ao longo do tempo. O último registo efectuado (288h), evidenciou que as modalidades '0,7g/L', '1g/L' e '1,5g/L' não apresentam diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$), embora apresentem diferenças significativas das modalidades 'sem tratamentos', 'imerso em água' e '0g/L' (modalidades sem quitosano). As modalidades com quitosano referidas ('0,7g/L', '1g/L' e '1,5g/L') não apresentam diferenças significativas da modalidade '2g/L'. Neste caso, os resultados sugerem que a presença de quitosano tenha influenciado esta coordenada colorimétrica.

3.2. Teor de humidade

3.2.1. Teor de humidade de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano não acondicionadas em atmosfera modificada após 10 dias de armazenamento a 4°C

Os dados referentes ao teor de humidade revelam que não há diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os controlos e os tratamentos com as diferentes concentrações de quitosano, portanto, não é possível associar o teor de humidade aos tratamentos aplicados. Os valores do teor de humidade variam entre 85,7 ([Q]=0g/L) e 87,1 ([Q]=2g/L), sendo muito semelhantes aos valores de humidade das fatias 'sem tratamentos' (Figura 3.7).

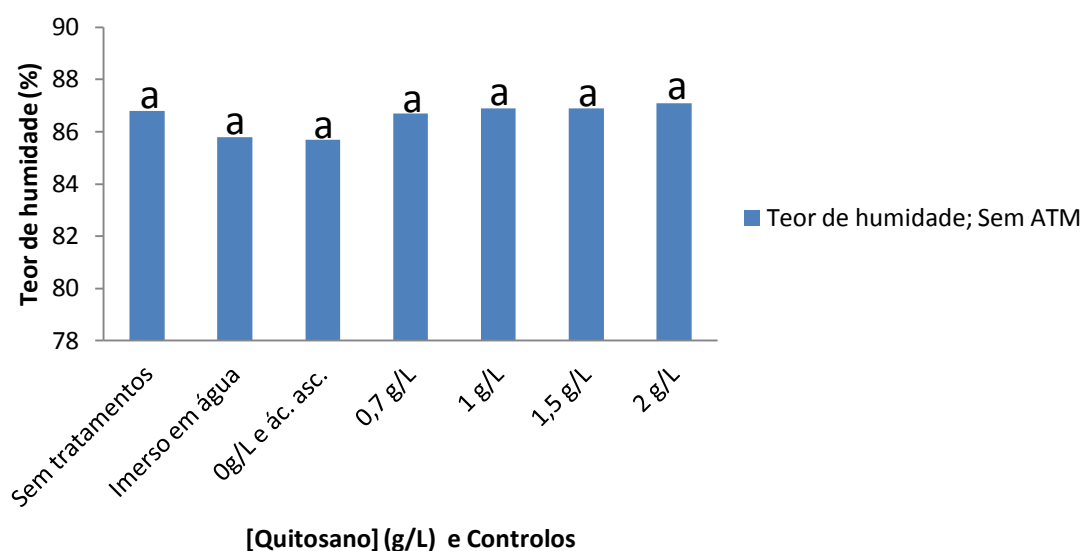


Figura 3.7 – Variação do teor de humidade em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.

Segundo Durango *et al.* (2006), os biofilmes de quitosano evitam a perda de humidade dos produtos alimentares, o que não é possível constatar com os resultados obtidos. Isto pode dever-se às condições em que foi realizado o ensaio, dentro de caixas de Petri, em contacto com o ar atmosférico. Também se pode dever à espessura do biofilme, que está directamente relacionada com a concentração de quitosano e com o tempo de imersão.

3.2.2. Teor de humidade de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano acondicionadas em atmosfera modificada após 16 dias de armazenamento a 4°C

Segundo dados do INSA (2007), o teor de humidade da pêra (5 variedades) é de cerca de 85%, valor muito próximo dos obtidos neste estudo.

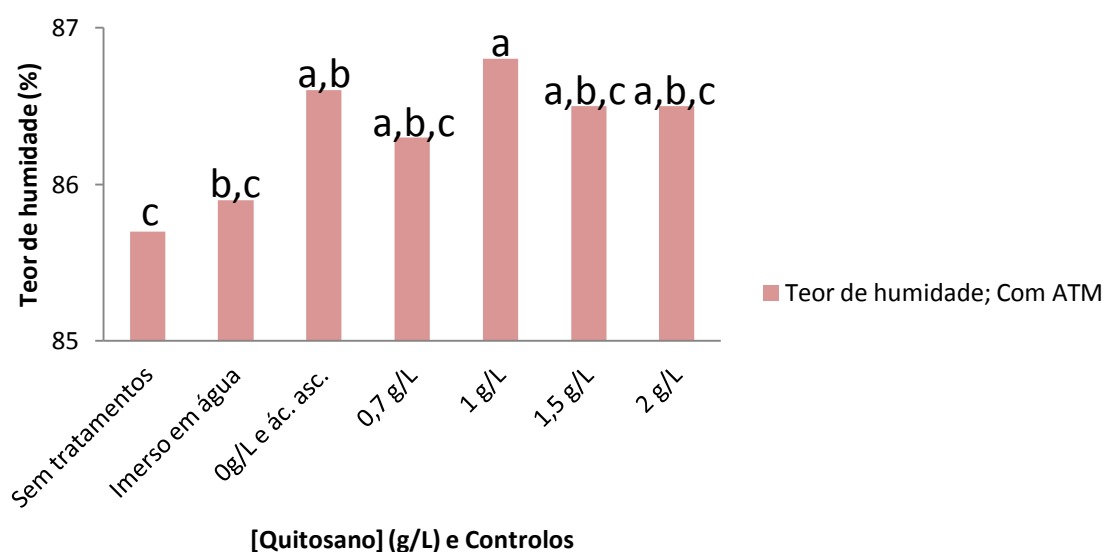


Figura 3.8 – Variação do teor de humidade em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.

Nas fatias de pêra 'Rocha' acondicionadas em ATM, verifica-se que o valor do teor de humidade correspondente à modalidade 'sem tratamentos' é o menor registado (85,7%), apresentando diferenças significativas com o valor máximo de humidade registado (86,8%), correspondente à concentração de quitosano igual a 1g/L ($P \leq 0,05$) (Figura 3.8).

No entanto, verifica-se que as concentrações de quitosano '0,7g/L', '1g/L', '1,5g/L' e '2g/L' não apresentam diferenças significativas de humidade entre si, pelo que se pode concluir que o quitosano em condições de atmosfera modificada reduz as perdas de humidade das fatias de pêra, mas na gama de concentrações estudadas não é possível apreciar diferenças significativas entre os tratamentos efectuados.

3.3. Sólidos solúveis totais

3.3.1. Fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano não acondicionadas em atmosfera modificada após 10 dias de conservação a 4°C

Os valores de SST obtidos nas fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM, revelam que não existem diferenças significativas em nenhuma das modalidades ($P \leq 0,05$) (Figura 3.9). Tal significa que os diferentes tratamentos aplicados não alteram o teor de SST das fatias de pêra.

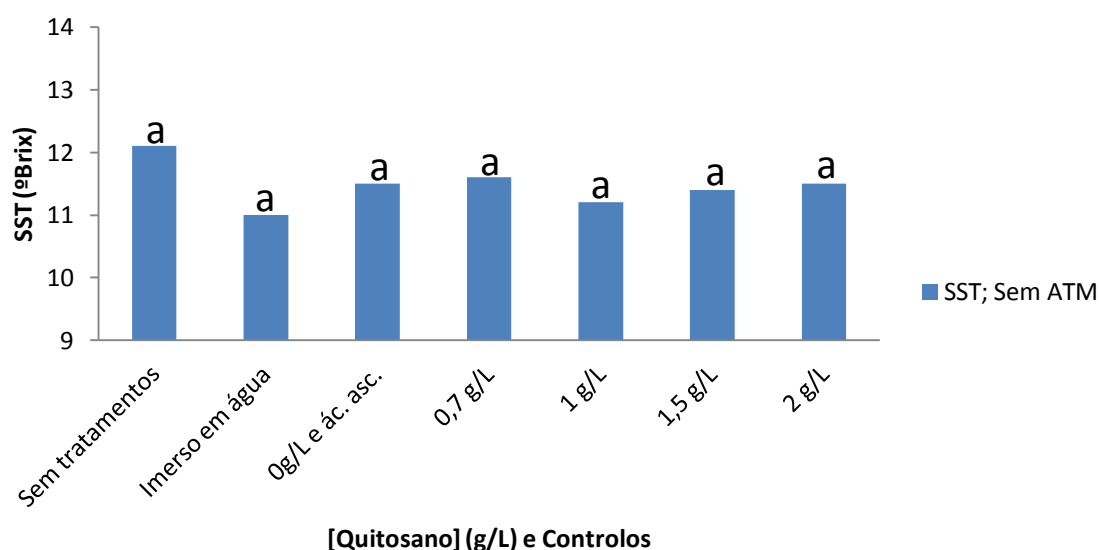


Figura 3.9 – Variação do teor de SST em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controles.

Os valores registados variam entre 11,0 ('imerso em água') e 12,1°Brix ('sem tratamentos'). Nos estudos de Kappel *et al.* (1995), com diversos cultivares de pêra (ao natural) obtiveram-se valores de sólidos solúveis totais entre 11,8 e 18,6°Brix. No caso particular da pêra 'Rocha', valores de SST de cerca de 14,5°Brix, são indicadores de um fruto de qualidade superior.

O teor de SST indica o grau de maturação da fruta, uma vez que 80% do teor de SST corresponde a açúcares, e o seu teor é tanto maior quanto maior for o grau de maturação. Os valores de SST relativamente baixos registados neste ensaio sugerem que as peras estariam pouco maduras (por apresentarem um baixo teor de açúcar). No entanto é preciso ter em conta que os frutos utilizados na experiência estavam destinados à exportação para países como o Canadá e Brasil, pelo que o grau de maturação das peras era adequado (Soares *et al.*, 2001).

3.3.2. Fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano acondicionadas em atmosfera modificada após 16 dias de armazenamento a 4°C

Em geral, os valores de SST obtidos para fatias acondicionadas em ATM (Figura 3.10) são inferiores que para fatias sem acondicionamento (Figura 3.9).

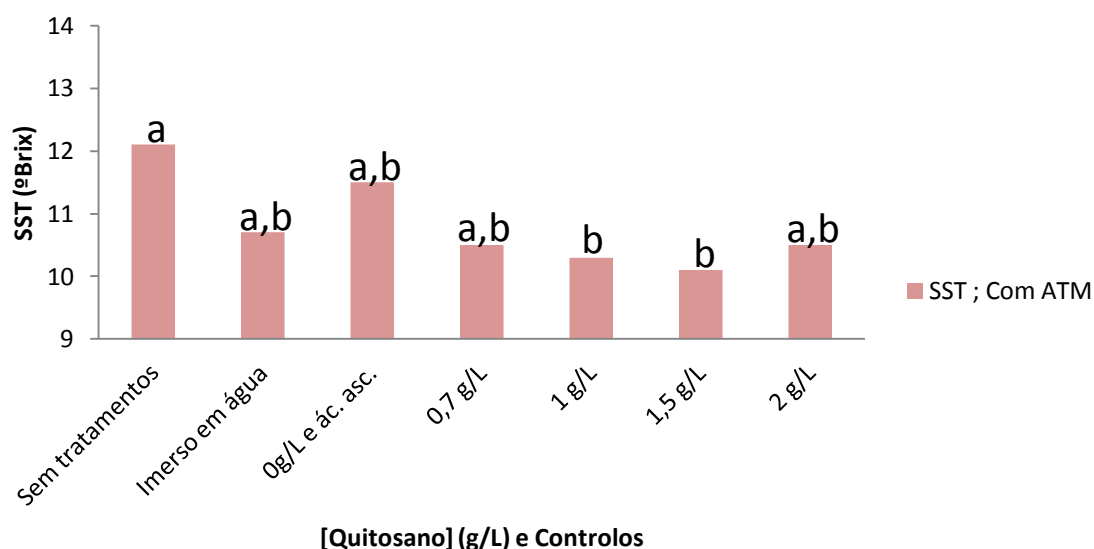


Figura 3.10 – Variação do teor de SST em fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controles.

À exceção das modalidades 'sem tratamentos' (12,1°Brix) e '0g/L', todas as restantes apresentam teores de SST inferiores a 11,0 °Brix. O mínimo valor registado foi de 10,1 para uma [Q]=1,5g/L. Na modalidade 'sem tratamentos' o valor de SST apresenta diferenças significativas dos valores obtidos nas concentrações de quitosano 1g/L e 1,5g/L, embora não se distinga das restantes modalidades. De uma forma geral, não existem diferenças significativas entre as diferentes concentrações de quitosano, o que não permite relacionar o teor de SST com algum tratamento em particular.

O teor de açúcares, e consequentemente os SST, é afectado pela ATM, uma vez que esta afecta o processo respiratório dos frutos. Assim, será de esperar que as fatias de pêra acondicionadas em ATM apresentem um menor teor de SST. Comparando as Figuras 3.9 e 3.10, observa-se que isto se verifica, especialmente tendo em conta que os tempos de conservação são diferentes, 10 dias de conservação para fatias não acondicionadas em ATM e 16 dias para as acondicionadas em ATM.

Assim, verifica-se que a utilização de biofilmes de quitosano, combinado com acondicionamento em ATM, reduz a taxa respiratória dos frutos permitindo, consequentemente, prolongar a vida útil do produto.

3.4. Dureza das fatias de pêra 'Rocha'

3.4.1. Dureza de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano não acondicionadas em atmosfera modificada após 10 dias de armazenamento a 4°C

Os valores de dureza registados para as fatias de pêra não acondicionadas em ATM não apresentam diferenças significativas nas diferentes modalidades ($P \leq 0,05$), o que sugere que este parâmetro não é afectado pelos tratamentos efectuados mas sim com as características próprias do produto. O valor mínimo obtido foi de 707,1g ([Q]=0,7g/L) e o máximo foi de 960,0g ([Q]=1,5g/L) (Figura3.11).

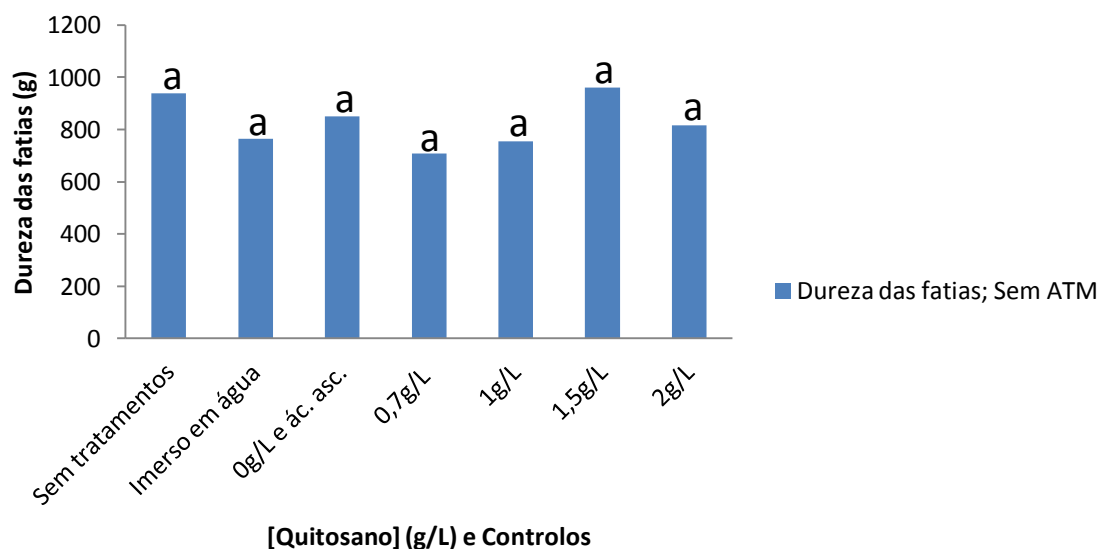


Figura 3.11 – Variação da dureza das fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.

3.4.2. Dureza de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano acondicionadas em atmosfera modificada após 16 dias de armazenamento a 4°C

Em condições de ATM, os valores de dureza registados para fatias de pêra não apresentam diferenças significativas nas diferentes modalidades ($P \leq 0,05$), o que sugere que este parâmetro não é influenciado pelos tratamentos efectuados. O intervalo de valores registado é de 703,7 ('imerso em água') a 897,5g ([Q]=1,5g/L) (Figura 3.12).

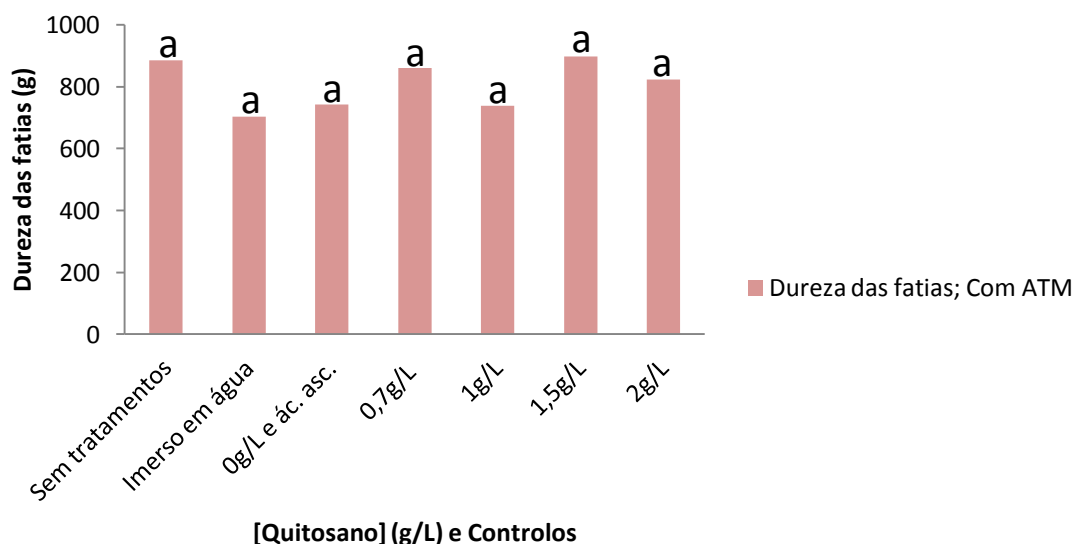


Figura 3.12 – Variação da dureza das fatias de pêra 'Rocha' tratadas com diferentes concentrações de quitosano e respectivos controlos.

Comparando os ensaios com e sem ATM, observa-se que o acondicionamento em ATM também não possui influencia nos valores de dureza das fatias de pêra.

3.5. Acidez titulável e pH

3.5.1. Acidez titulável e pH de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano não acondicionadas em atmosfera modificada após 10 dias de armazenamento a 4°C

Os resultados de acidez titulável não apresentam diferenças significativas entre as diversas modalidades de fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM ($P \leq 0,05$) (Figura 3.13).

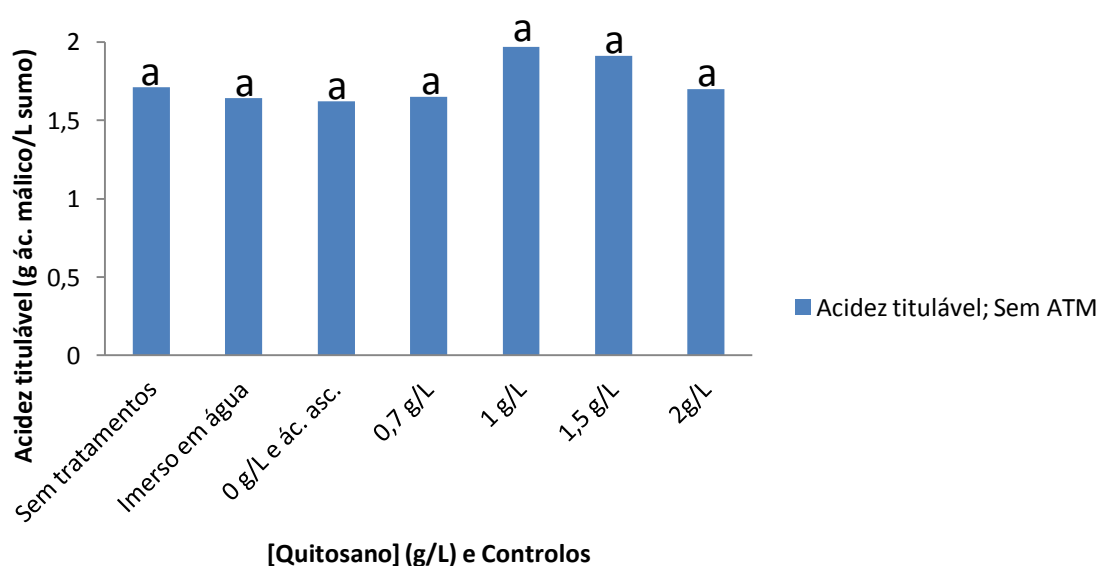


Figura 3.13 – Variação da acidez titulável em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.

O valor de acidez mais elevado obtido foi de 1,97g ácido málico/L sumo, na concentração de quitosano de 1g/L e o menor valor foi de 1,62 na modalidade '0g/L' (Figura 3.13). Segundo Soares (2001), o valor limite para a acidez titulável das peras 'Rocha' na fase de colheita é de cerca de 2,2g de ácido málico/L sumo, e poderá situar-se até às 2,0g ácido málico/L sumo, sem que a qualidade final dos frutos, após conservação, seja comprometida. Como ao longo da maturação o teor de ácido tende a diminuir, dado que estas peras estavam maduras, era expectável que este valor estivesse um pouco mais abaixo dos valores referidos.

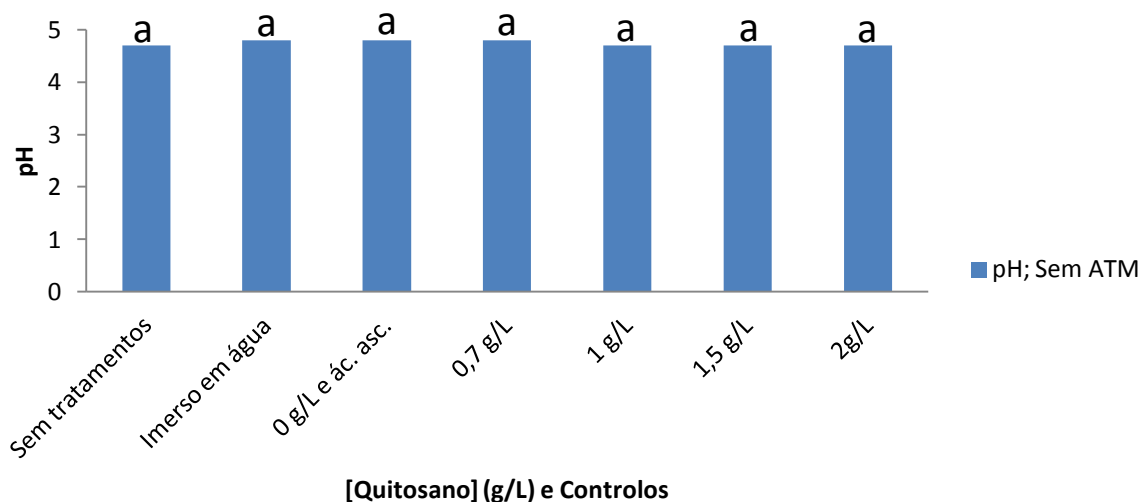


Figura 3.14 – Variação do pH em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.

Os valores de pH variaram entre 4,73 ([Q]=1,5g/L) e 4,81 ([Q]=0,7g/L) (Figura3.14), apresentando apenas este último valor, diferenças significativas relativamente aos restantes ($P \leq 0,05$).

Os resultados sugerem que, o facto das fatias terem sido imersas em soluções de quitosano com ácido ascórbico, não fez variar significativamente os valores de pH das peras.

Dados da FDA (2007), indicam que o pH das peras pode variar de 3,5 a 4,6, valores próximos aos obtidos experimentalmente.

3.5.2. Acidez titulável e pH de fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano acondicionadas em atmosfera modificada após 16 dias de armazenamento a 4°C

Os valores de acidez titulável em fatias de pêra 'Rocha' acondicionadas em ATM oscilaram entre 1,04 ('imerso em água') e 1,6g ácido málico/L sumo ([Q]=0,7g/L) (Figura3.15).

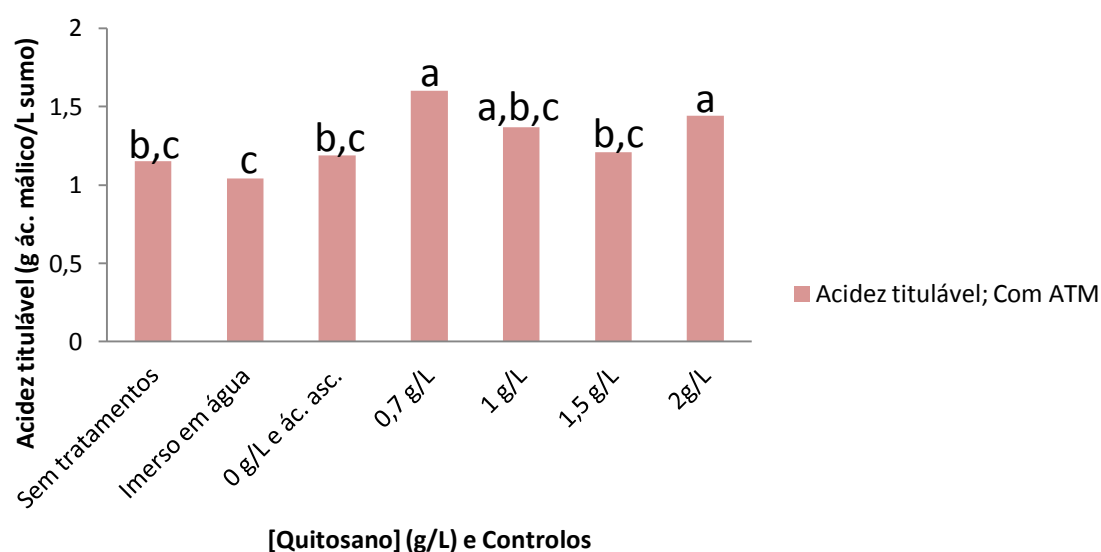


Figura 3.15 – Variação da acidez titulável em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.

Comparando os valores obtidos, verifica-se que as modalidades 'sem tratamentos', 'imerso em água' e '0g/L' apresentam diferenças significativas com as modalidades '0,7g/L' e '2g/L' ($P \leq 0,05$).

Entre as várias concentrações de quitosano não se verificam diferenças significativas. Em geral, pode observar-se que nas fatias que foram tratadas com quitosano e acondicionadas em atmosfera modificada houve um ligeiro aumento da acidez titulável, efeito que não foi observado em fatias não acondicionadas em ATM (Figura3.13).

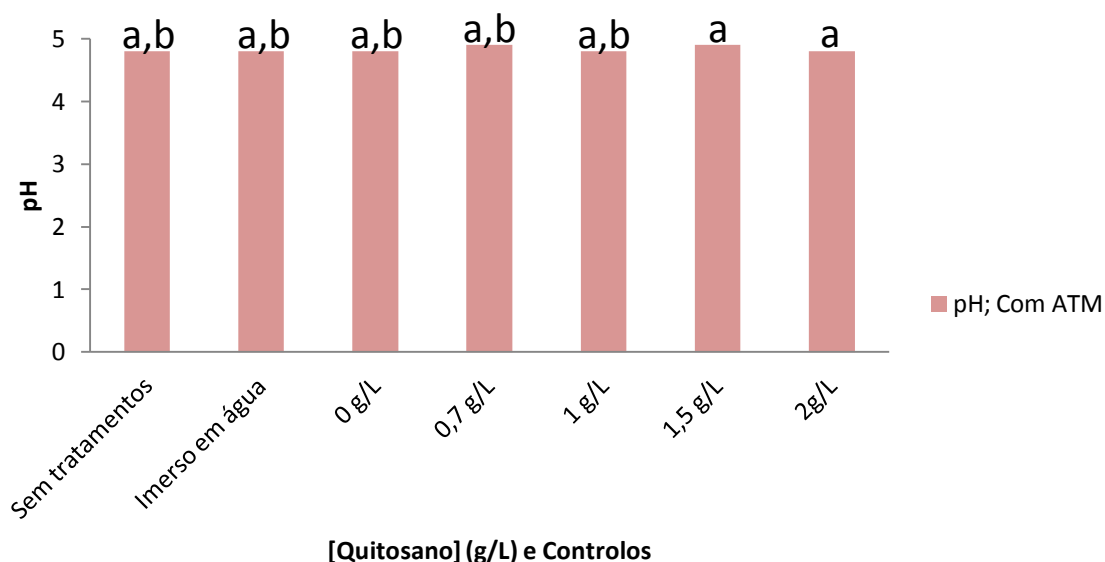


Figura 3.16 – Variação do pH de fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos.

Em relação ao pH (Figura3.16), verifica-se que não existem diferenças significativas entre os valores ($P \leq 0,05$). Estes resultados sugerem que os diferentes tratamentos aplicados às fatias de pêra ‘Rocha’ não têm influencia no pH. Os valores de pH registados oscilam entre 4,76 e 4,94 e são concordantes com os valores descritos para peras (FDA, 2007).

3.6. Teor de glícidos

Após injeção das amostras de pêra ‘Rocha’, obteve-se um cromatograma característico (Figura3.17), para todas as amostras analisadas, obtendo-se picos com diferentes tempos de retenção. O primeiro pico corresponde à injeção ao solvente, o segundo pico corresponde à sacarose, que possui um tempo de retenção por volta dos 8 minutos, sucedendo-se a glucose, com um tempo de retenção de cerca de 10 minutos, depois a frutose, com um tempo de retenção de aproximadamente 2 minutos e, por fim, o sorbitol, com o maior tempo de retenção, de cerca de 17 minutos.

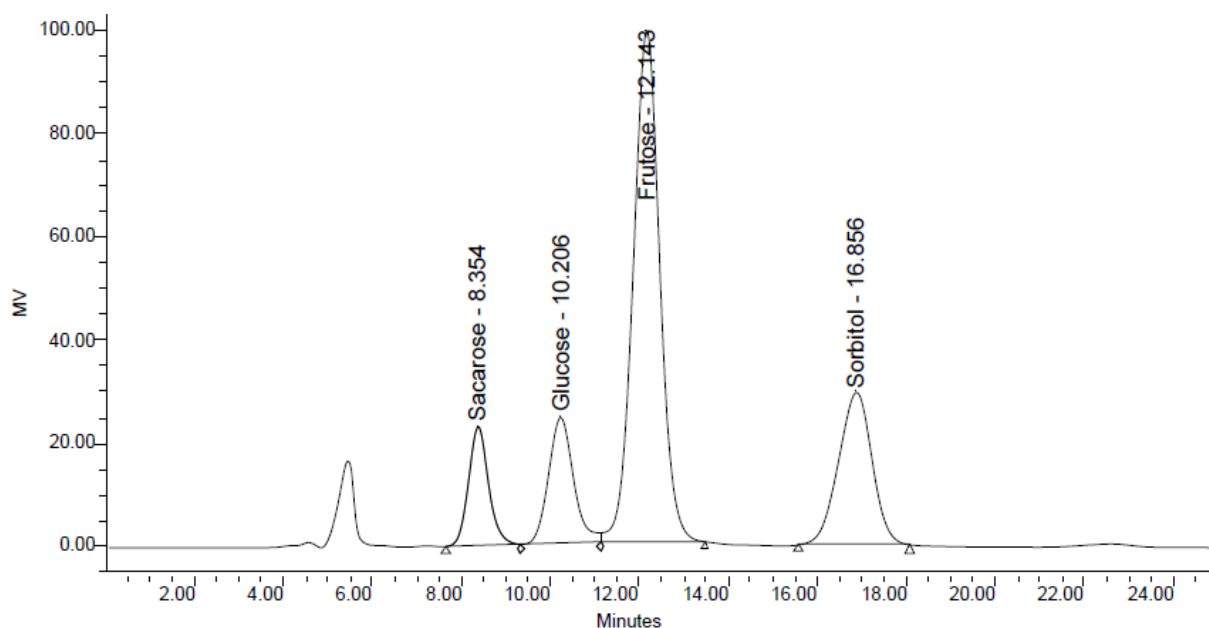


Figura 3.17 – Cromatograma característico, obtido do HPLC, efectuado a fatias de pêra 'Rocha'.

3.6.1. Teor de glicídios em fatias não acondicionadas em atmosfera modificada

Relativamente aos teores de sacarose, em fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM, pode afirmar-se com 95% de probabilidade que não apresentam diferenças significativas entre si. Estes apresentam um valor mínimo de 0,51 ([Q]=0,7g/L) e um valor máximo de 0,82g/100g PF ('sem tratamentos') (Figura3.18).

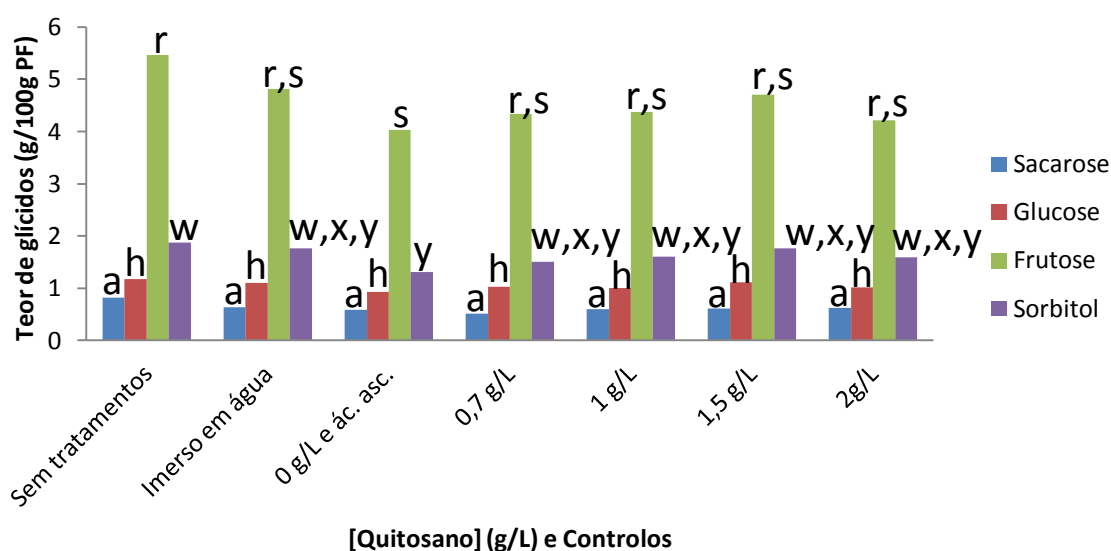


Figura 3.18 – Variação do teor de glicídios em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, não acondicionadas em ATM.

Quanto aos teores de glucose, constata-se que também estes não possuem diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). Estes variam de 0,93 ([Q]=0g/L) a 1,17g/100g PF ('sem tratamentos').

Os teores de frutose das modalidades 'sem tratamentos' e '0g/L' apresentam diferenças significativas entre si. Nas restantes modalidades, os teores de frutose não apresentam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). O teor deste açúcar varia entre 4,03 ([Q]=0g/L) e 5,46g/100g PF ('sem tratamentos').

Por fim, quanto ao sorbitol, verifica-se que as modalidades com quitosano ('0,7g/L', '1g/L', '1,5g/L e '2g/L') e a modalidade 'imerso em água' não apresentam diferenças significativas nos teores deste açúcar. Na modalidade '0g/L' o teor de sorbitol é significativamente diferente do da modalidade 'sem tratamentos', embora nesta modalidade o teor de sorbitol seja estatisticamente semelhante ao da 'imerso em água' ($P \leq 0,05$). O teor de sorbitol mínimo obtido foi de 1,31 ([Q]=0g) e máximo foi de 1,87 ('sem tratamentos').

Verifica-se que o teor de frutose (açúcar redutor), comparando com o dos restantes glícidos, é muito superior em todas as modalidades e varia, no caso das peras acondicionadas sem ATM, de 4,03 a 5,46g/100g PF. Depois da frutose, o segundo açúcar mais abundante na pêra 'Rocha' é o sorbitol, cuja quantidade média (1,62g/100g PF) é cerca do triplo do teor de frutose (5,2g/100g PF). Segue-se o açúcar redutor glucose (média=1,05g/100g PF) e posteriormente o açúcar não redutor sacarose (média=1,26g/100g PF).

Em todos os glícidos referidos (sacarose, glucose, frutose e sorbitol), verificou-se que o valor máximo registado correspondia sempre à modalidade 'sem tratamentos', o que provavelmente indica que os tratamentos efectuados afectam o teor de glícidos das fatias de pêra, ainda que ligeiramente, embora estatisticamente, na maior parte dos casos, não se verifiquem diferenças significativas.

Richmond *et al.* (1981) referem que a frutose é o glícido mais abundante das peras, seguido do sorbitol, embora contrariamente ao que ocorre, este autor refira ainda que a glucose e a sacarose estão presentes em quantidades similares. Outros estudos efectuados com a pêra *Williams* apoiam os estudos de Richmond (Hudina e Stampar, 2000). No presente estudo, verifica-se que a pêra 'Rocha' possui um teor de glucose superior ao de sacarose, contrariamente ao que é defendido por Richmond para peras *Williams*, o que se pode dever às diferenças entre as variedades e a um possível estado de maturação também ele diferente, o que tem uma implicação directa no teor de glícidos.

3.6.2. Teor de glícidos em fatias acondicionadas em atmosfera modificada

Nas peras acondicionadas em ATM verifica-se a mesma tendência nas quantidades de glícidos, isto é, a frutose destaca-se por ser o glícido predominante, apresentando em média exactamente o triplo (5,04g/100g PF) da quantidade média do segundo glícido mais abundante, o sorbitol (1,68g/100g PF) (Figura3.19).

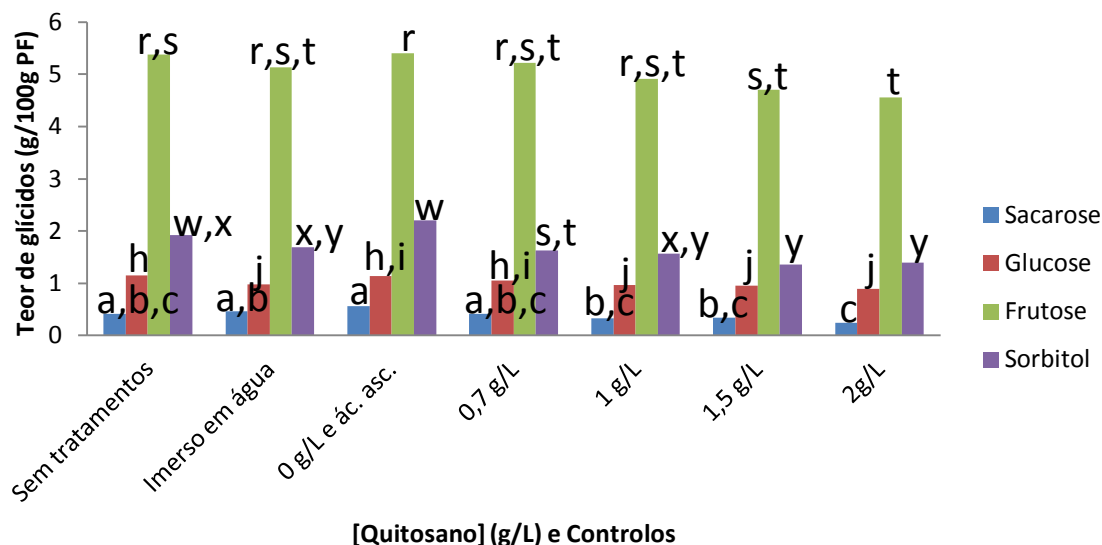


Figura 3.19 – Variação do teor de glicídios em fatias de pêra ‘Rocha’ imersas em diferentes concentrações de quitosano e controles, acondicionadas em ATM.

Depois do sorbitol, o terceiro glicídio mais abundante é a glucose e por fim a sacarose, tal como acontece nas fatias sem ATM. Note-se que a quantidade de sacarose média (0,39g/100g PF) corresponde a menos de metade da quantidade de glucose (1,02g/100g PF).

Os teores de sacarose variam entre 0,24 ([Q]=2g/L) e 0,56g/100g PF ([Q]=0g/L) nas diferentes modalidades. Nas modalidades ‘sem tratamentos’ e ‘0,7g/L’ esses teores não possuem diferenças significativas, com 95% de probabilidade. Nas modalidades ‘1g/L’ e ‘1,5g/L’ também não se verificam diferenças significativas entre si. Já nas concentrações de quitosano ‘0g/L’ e ‘2g/L’ pode afirmar-se que existem diferenças significativas com 95% de probabilidade. As primeiras quatro modalidades, isto é, ‘sem tratamentos’, ‘imerso em água’, ‘0g/L’ e ‘0,7g/L’, não apresentam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Quanto às restantes modalidades, ‘1g/L’, ‘1,5g/L’ e ‘2g/L’, também não se observam diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$).

Nos teores de glucose é possível constatar com 95% de probabilidade, que não existem diferenças significativas entre os teores das modalidades ‘0g/L’ e ‘0,7g/L’. Verifica-se ainda que estas modalidades não apresentam diferenças significativas da modalidade ‘sem tratamentos’ mas o conjunto das três apresenta diferenças significativas com as restantes modalidades: ‘imerso em água’, ‘1g/L’, ‘1,5g/L’ e ‘2g/L’. As quatro modalidades referidas anteriormente não possuem, por sua vez, diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$).

Relativamente à frutose, verifica-se que não existem diferenças significativas entre as modalidades ‘0,7g/L’, ‘1g/L’ e ‘imerso em água’ ($P \leq 0,05$). As modalidades ‘1,5g/L’ e ‘2g/L’ apresentam diferenças

significativas da modalidade '0g/L'. A modalidade '2g/L' apresenta ainda diferenças significativas da modalidade 'sem tratamentos'. As cinco primeiras modalidades: 'sem tratamentos', 'imerso em água', '0g/L', '0,7g/L' e '1g/L' não apresentam diferenças significativas entre si, com uma probabilidade de 95%.

Os teores de sorbitol variam entre 1,36 ([Q]=1,5g/L) e 2,20g/100g PF ([Q]=0g/L). As duas modalidades com maior teor de quitosano, [Q]=1,5g/L e [Q]=2g/L, apresentam diferenças significativas das modalidades '0g/L' e 'sem tratamentos' ($P \leq 0,05$). As modalidades '0,7g/L' e '1g/L' também não apresentam diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). A modalidade '0g/L' apenas não apresenta diferenças significativas com a modalidade 'sem tratamentos', embora apresente diferenças significativas das restantes modalidades ($P \leq 0,05$).

No caso das fatias acondicionadas em ATM não se verifica que a modalidade 'sem tratamentos' seja a que possui sempre o maior teor de cada um dos quatro glicídios identificados. Assim, não é possível estabelecer o mesmo raciocínio quanto à influência dos tratamentos no teor dos glicídios.

3.7. Compostos fenólicos

3.7.1. Fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em atmosfera modificada

Os teores de compostos fenólicos em fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM, oscilaram entre 49,3 ('sem tratamentos') e 101,1gEAG/100g ([Q]=0,7g/L) (Figura 3.20).

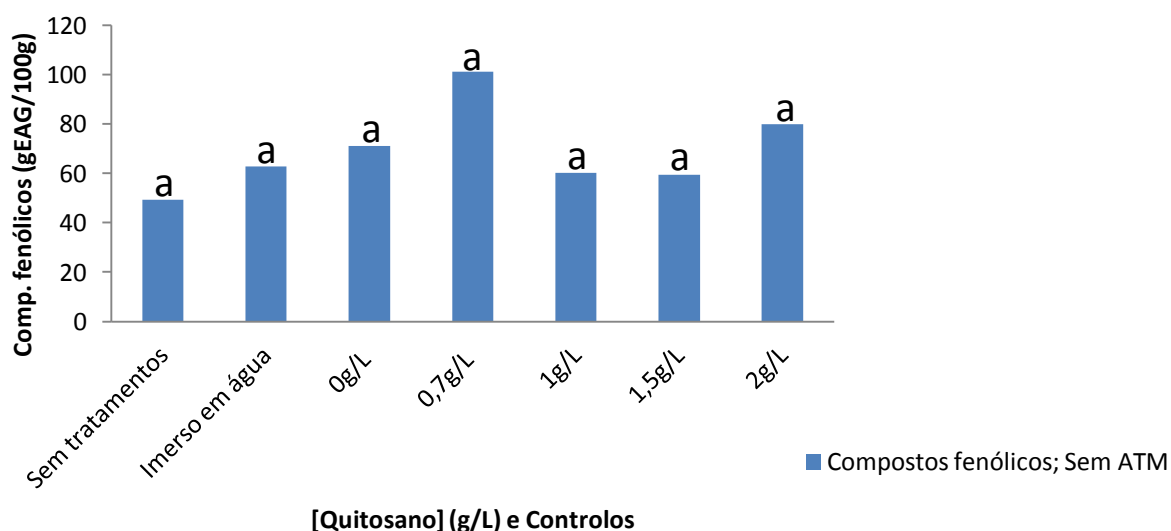


Figura 3.20 – Variação do teor de compostos fenólicos em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos não acondicionadas em ATM.

Nenhum valor apresentou diferenças significativas, em qualquer modalidade ($P \leq 0,05$), o que não nos permite relacionar o teor de compostos fenólicos com os tratamentos efectuados. No entanto, os tratamentos aplicados, quer a aplicação de quitosano dissolvido em ácido ascórbico, quer a aplicação exclusiva de ácido ascórbico, protegem/ evitam a oxidação das peras. Teoricamente, quanto maior for o poder oxidante do tratamento, maior é o teor de compostos fenólicos do fruto, embora não seja o que se verifica nesta experiência.

A actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se, sobretudo, às suas propriedades de oxidação-redução de quinonas, as quais permitem neutralizar os radicais livres, quelando o oxigénio das espécies reactivas de oxigénio ou por decomposição de peróxidos.

O teor de compostos fenólicos obtido depende de factores intrínsecos como o género, espécie e o tipo de cultivar e ainda de factores extrínsecos como as condições ambientais, a forma de cultivo e as condições de armazenamento (Barberan e Espin, 2001).

3.7.2. Fatias de pêra 'Rocha' acondicionadas em atmosfera modificada

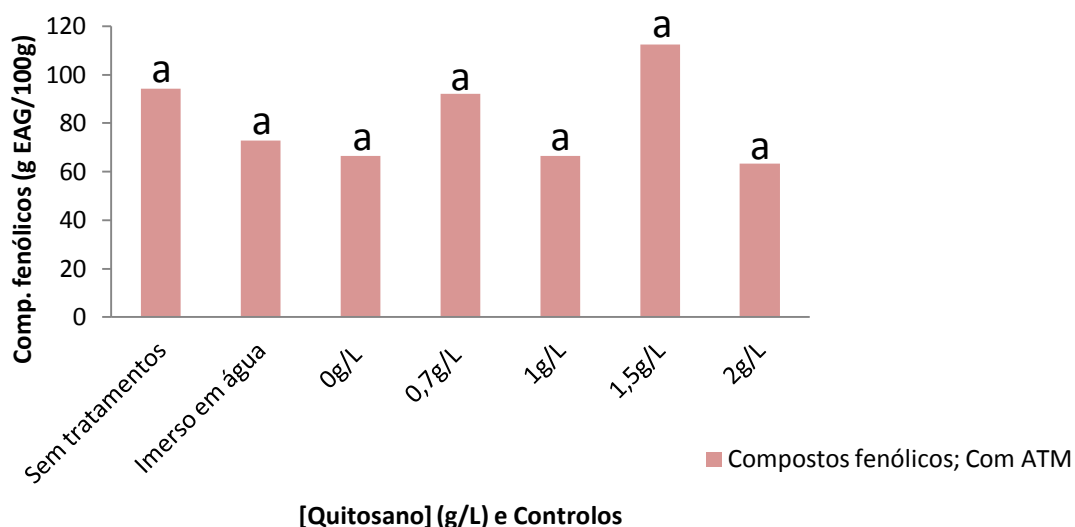


Figura 3.21 – Variação do teor de compostos fenólicos em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas em ATM.

O teor dos compostos fenólicos em fatias de pêra 'Rocha' acondicionadas em ATM não apresenta diferenças significativas, com 95% de probabilidade (Figura3.21). Registaram-se valores que oscilaram entre 63,4 ([Q]=2g/L) e 112,5gEAG/100g, que correspondem a duas concentrações de quitosano muito próximas. Os resultados obtidos, à semelhança dos obtidos nas peras não

acondicionadas em ATM, não permitiram estabelecer qualquer relação entre o teor de compostos fenólicos e os diferentes tratamentos efectuados.

3.8. Ácido ascórbico

3.8.1. Fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em atmosfera modificada

Com uma probabilidade de 95%, os teores de ácido ascórbico não apresentam diferenças significativas nas diversas modalidades. Desta forma, o ácido ascórbico utilizado para dissolver o quitosano, dando origem à solução que é utilizada na imersão das fatias de pêra 'Rocha', não acresce o teor de ácido ascórbico ao existente naturalmente no fruto, facto que também é apoiado pelo teor da modalidade 'sem tratamentos' possuir um teor muito semelhante (ou mesmo inferior) ao das modalidades com quitosano. Os resultados sugerem então que o teor de ácido ascórbico se relaciona apenas com as características próprias do fruto e não com os tratamentos aplicados (Figura 3.22).

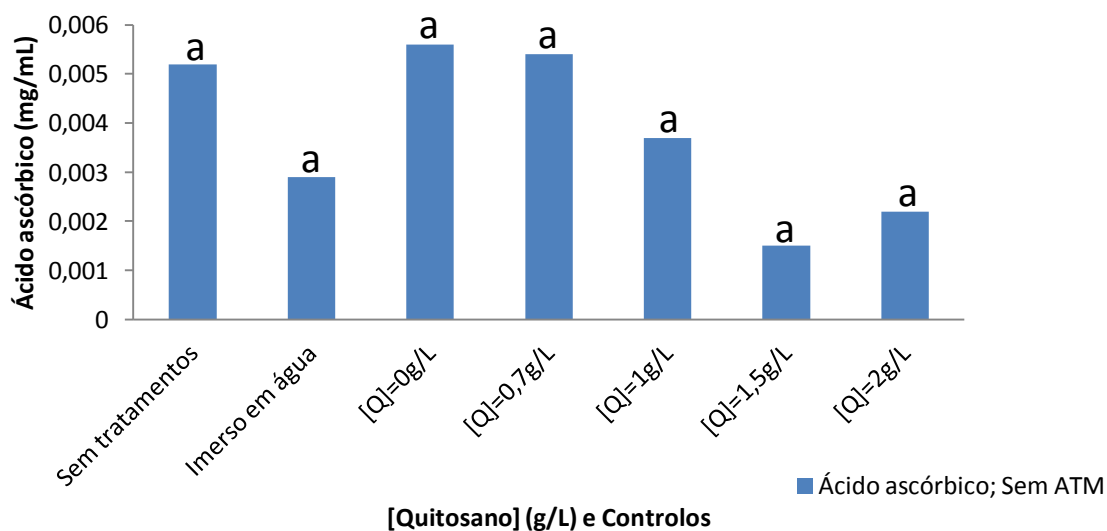


Figura 3.22 – Variação do teor de ácido ascórbico em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, não acondicionadas em ATM.

3.8.2. Fatias de pêra 'Rocha' acondicionadas em atmosfera modificada

Os dados obtidos permitem verificar que o teor de ácido ascórbico correspondente à modalidade '0g/L' possui diferenças significativas com os restantes valores e que estes não possuem diferenças significativas entre si, com uma probabilidade de 95% (Figura 3.23). Desta forma, os resultados sugerem que os tratamentos aplicados não têm influência no teor de ácido ascórbico das peras. A oxidação da vitamina C é regulada, sobretudo, pela oxidase do ácido ascórbico e por outras enzimas com baixa afinidade para o oxigénio. Desta forma, em condições com baixos teores de O₂, como ocorre por aplicação de ATM, a conversão de ácido ascórbico a ácido desidroascórbico é retardada (Aquino, 2006).

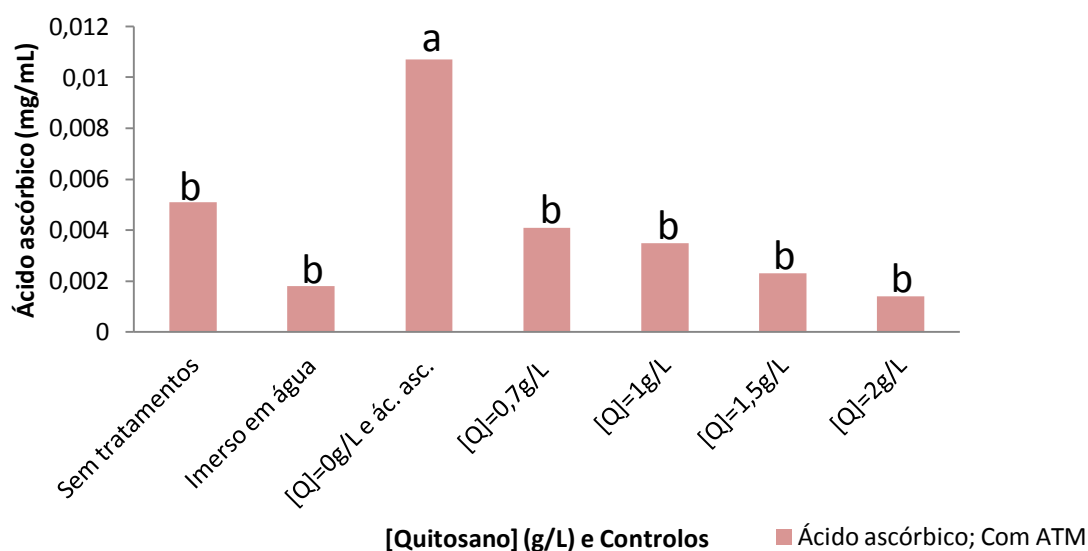


Figura 3.23 – Variação do teor de ácido ascórbico em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas em ATM.

3.9. Análises microbiológicas

3.9.1. Microrganismos mesófilos

Em fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM, o número de UFC de mesófilos por grama não apresentou diferenças significativas, em qualquer das modalidades ($P \leq 0,05$) (Figura 3.24).

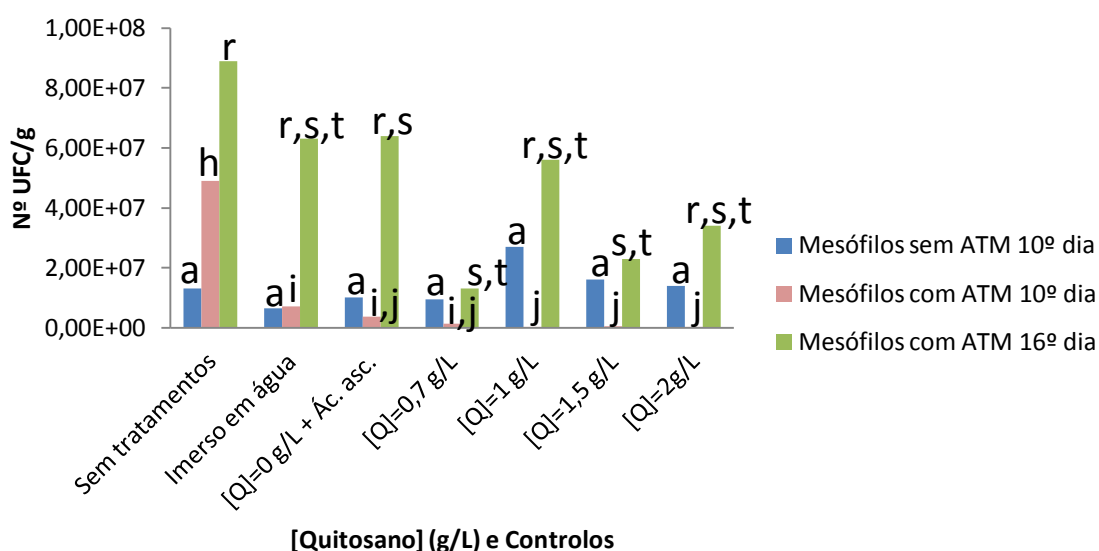


Figura 3.24 – Variação de mesófilos em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controles, acondicionadas ou não em ATM, 10 e 16 dias após o fatiamento.

Comparando os resultados obtidos com os valores-guia elaborados pelo INSA, verifica-se que todos foram considerados 'não satisfatórios', uma vez que o número de UFC/g foi superior a 10^6 (Figura 3.24). Deste modo, nas condições do ensaio não se constatou o efeito antimicrobiano do quitosano, referido na literatura (No *et al*, 2007). É importante destacar que em todos os ensaios, as etapas de fatiamento e imersão das fatias não foram realizadas em condições de esterilidade. Por outro lado, para as etapas de inoculação e incubação foram utilizadas placas de meio PCA como controles de esterilidade.

Em fatias de pêra 'Rocha' acondicionadas em ATM com 10 dias de conservação a 4°C observou-se que a contaminação por mesófilos na modalidade 'sem tratamentos' foi significativamente superior que em todas as restantes modalidades (Figura 3.24). Verificou-se ainda que as modalidades com quitosano, [Q]=1g/L, [Q]=1,5g/L e [Q]=2g/L, possuíam diferenças significativas com as modalidades, 'sem tratamentos' e 'imerso em água', embora entre si não apresentassem diferenças significativas ($P \leq 0,05$). As modalidades com quitosano correspondem às menos contaminadas e a modalidade 'sem tratamentos' corresponde à mais contaminada, o que sugere que a presença de quitosano numa atmosfera modificada possui um efeito inibidor do crescimento de mesófilos. No entanto, na gama de

concentrações estudada, não se verifica uma relação directa entre a quantidade de quitosano aplicada e o efeito antimicrobiano.

Comparando os resultados obtidos com os valores-guia propostos pelo INSA, verifica-se que só as modalidades com maior teor de quitosano, '1g/L' ($\text{UFC/g}=3,06 \times 10^5$), '1,5g/L' ($\text{UFC/g}=5,76 \times 10^5$) e '2g/L' ($\text{UFC/g}=3,24 \times 10^5$), possuem números de UFC/g considerados como 'aceitáveis' dado que são inferiores a 10^6 .

Após 10 dias de conservação, comparando os níveis de mesófilos em fatias de pêra, acondicionadas e não acondicionadas em ATM, verifica-se que é nas acondicionadas em ATM, nas modalidades com quitosano e na modalidade '0g/L' (que apenas possui ácido ascórbico) que o número de UFC/g foi inferior. Este facto sugere que os tratamentos aplicados (quitosano e ATM) tiveram acção antimicrobiana, como referido na literatura (No *et al.*, 2007).

Em geral, depois de 16 dias de conservação, verificou-se um incremento considerável da contaminação por mesófilos em todas as modalidades relativamente aos 10 dias (Figura3.24). As modalidades '0,7g/L' e '1,5g/L' correspondem às modalidades menos contaminadas e apresentam diferenças significativas com a modalidade 'sem tratamentos'.

Pela seguinte ordem, observa-se uma decrescente contaminação: 'sem tratamentos' ($8,9 \times 10^7$ UFC/g), '0g/L' ($6,4 \times 10^7$ UFC/g), 'imerso em água' ($6,3 \times 10^7$ UFC/g), '1g/L' ($5,6 \times 10^7$ UFC/g), '2g/L' ($3,4 \times 10^7$ UFC/g), '1,5g/L' ($2,3 \times 10^7$ UFC/g) e '0,7g/L' ($1,3 \times 10^7$ UFC/g). Embora as diferenças não sejam tão marcadas como aos 10 dias, estes resultados indicam uma menor contaminação nas modalidades com quitosano. Não obstante, verifica-se que todas as modalidades apresentam valores de UFC/g considerados 'não satisfatórios' (superiores a 10^6).

Assim, no que respeita a microrganismos mesófilos, pode concluir-se que o quitosano, nas condições e gama de concentrações testada, exerce certa acção antimicrobiana, mas não é suficiente para estender o período de conservação das fatias de pêra nos termos da segurança alimentar.

3.9.2. Microrganismos psicrófilos

O número de UFC de psicrófilos em fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM após 10 dias de conservação não apresentou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as diferentes modalidades (Figura3.26). No entanto, observou-se uma decrescente contaminação pela seguinte ordem: '0g/L' ($3,7 \times 10^7$ UFC/g), '0,7g/L' (2×10^7 UFC/g), '1g/L' (9×10^6 UFC/g), 'sem tratamentos' ($7,2 \times 10^6$ UFC/g), '1,5g/L' ($5,4 \times 10^6$ UFC/g), '2g/L' (5×10^6 UFC/g) e 'imerso em água' ($2,7 \times 10^6$ UFC/g).

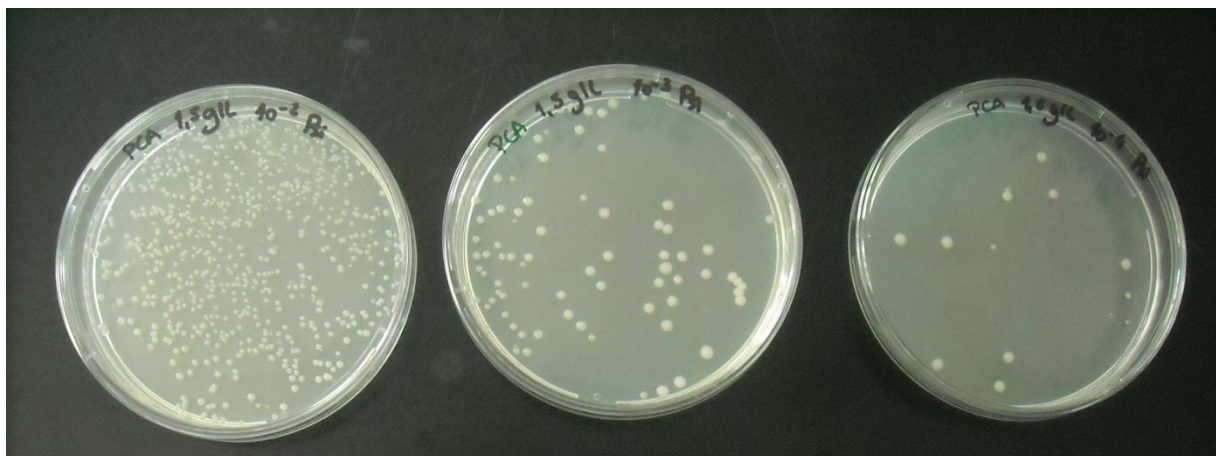


Figura 3.25 – Colônias de microrganismos psicrófilos crescidas em placas de PCA inoculadas com sumo de fatias de pêra ‘Rocha’ imersas numa solução de quitosano de 1,5g/L, acondicionadas em ATM (da direita para a esquerda, diluições: 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}).

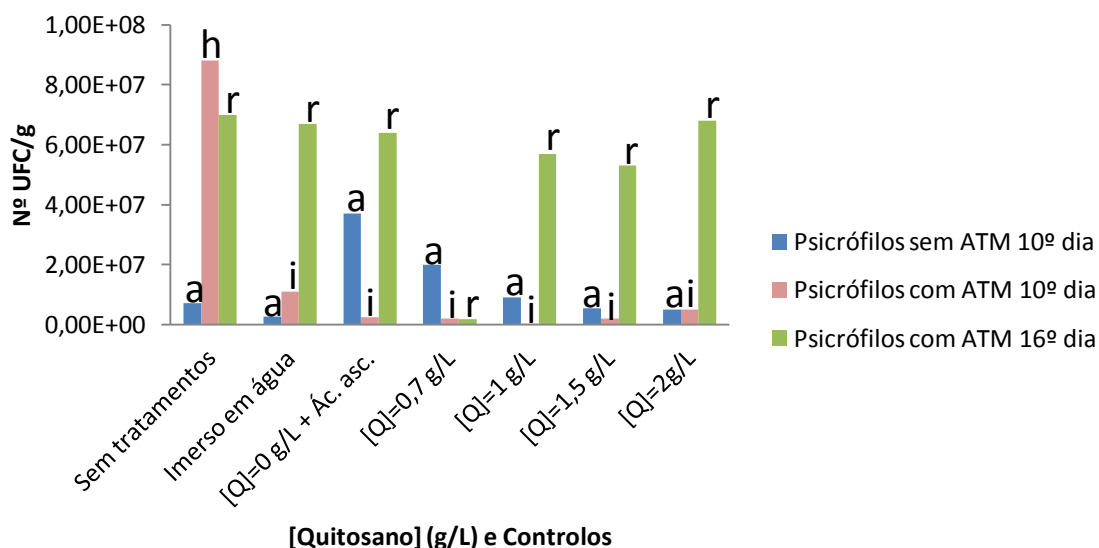


Figura 3.26 – Variação do número de UFC de microrganismos psicrófilos em fatias de pêra ‘Rocha’ (UFC/g) imersas em diferentes concentrações de quitosano e correspondentes controlos, acondicionadas ou não em ATM, 10 e 16 dias após o fatiamento.

Relativamente às fatias de pêra ‘Rocha’ acondicionadas em ATM após 10 dias de conservação, verifica-se que apenas a modalidade ‘sem tratamentos’ é significativamente diferente das restantes modalidades ($P \leq 0,05$), sendo a contaminação nestas fatias consideravelmente superior. Entre modalidades, podemos verificar a seguinte tendência decrescente de contaminação: ‘sem tratamentos’ ($8,8 \times 10^7$ UFC/g), ‘imerso em água’ ($1,1 \times 10^7$ UFC/g), ‘2g/L’ (5×10^6 UFC/g), ‘0g/L’ ($2,4 \times 10^6$ UFC/g), ‘0,7g/L’ ($1,9 \times 10^6$ UFC/g), ‘1,5g/L’ ($1,9 \times 10^6$ UFC/g) e ‘1g/L’ ($2,3 \times 10^5$ UFC/g).

Comparando o número de UFC/g de psicrófilos em fatias de pêra ‘Rocha’ acondicionadas e não acondicionadas em ATM com 10 dias de conservação, verifica-se que, acondicionadas em ATM,

todas as modalidades com quitosano e mesmo a modalidade que apenas possuía ácido ascórbico, apresentaram menor contaminação por este tipo de microrganismos, excepto na modalidade '2g/L', que manteve o número de UFC/g. Depois de 16 dias de conservação, o número de UFC de psicrófilos aumentou consideravelmente mas, não se observaram diferenças significativas entre as distintas modalidades ($P \leq 0,05$). Ainda assim é possível verificar que existe uma tendência decrescente de contaminação na seguinte ordem: 'sem tratamentos' ($6,98 \times 10^7$ UFC/g), '2g/L' ($6,75 \times 10^7$ UFC/g), 'imerso em água' $6,7 \times 10^7$ UFC/g), '0g/L' ($6,4 \times 10^7$ UFC/g), '1g/L' ($5,7 \times 10^7$ UFC/g), '1,5g/L' ($5,3 \times 10^7$ UFC/g) e '0,7g/L' ($1,8 \times 10^6$ UFC/g).

Contrariamente ao esperado, a modalidade '2g/L' é a segunda mais contaminada. Contudo, uma vez que a maioria das modalidades com quitosano corresponde às menos contaminadas, só é possível explicar este resultado por uma contaminação posterior.

3.9.3. Fungos e leveduras

Relativamente ao desenvolvimento de fungos e leveduras, em fatias de pêra 'Rocha' não acondicionadas em ATM, com 10 dias de conservação, verifica-se que não existem diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as diversas modalidades. Contudo, o maior crescimento de fungos e leveduras verificou-se na concentração de 1g/L ($1,26 \times 10^4$ UFC/g) e o menor crescimento verificou-se na maior concentração de quitosano (2g/L), onde não ocorreu o desenvolvimento de nenhuma UFC por grama de pêra (Figura 3.27).

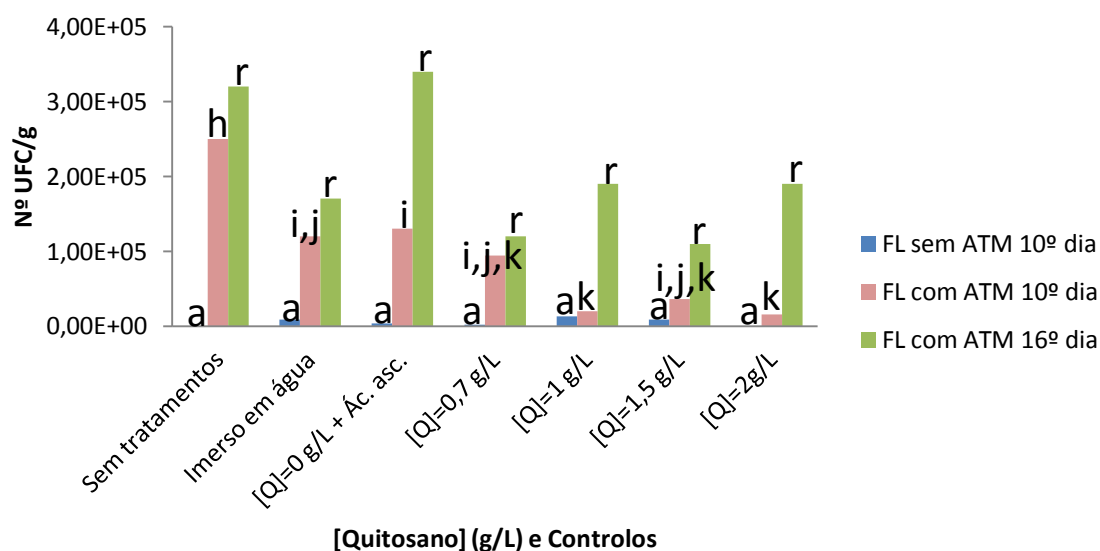


Figura 3.27 – Variação dos fungos e leveduras em fatias de pêra 'Rocha' imersas em diferentes concentrações de quitosano e controlos, acondicionadas ou não em ATM, 10 e 16 dias após o fatiamento.

Tendo em conta que a modalidade 'sem tratamentos' registou igual número de UFC/g que a modalidade '2g/L', e que com a modalidade '1,5g/L' se formou igual número de UFC/g que com a modalidade 'imerso em água', neste caso não foi possível estabelecer qualquer relação entre os tratamentos aplicados e o efeito antifúngico do quitosano (No *et al.*, 2007).

A tabela de valores-guia propostos pelo INSA considera como 'aceitáveis' valores de fungos não superiores a 10^3 UFC/g, e para leveduras, valores entre 10^2 e 10^5 UFC/g. Tendo em conta que nos ensaios realizados estes microrganismos não foram diferenciados, pode considerar-se que, em geral, todas as modalidades tiveram valores 'aceitáveis'.

Nas fatias acondicionadas em ATM com 10 dias de conservação, observa-se que na modalidade 'sem tratamentos', a contaminação por fungos e leveduras foi significativamente superior que nas restantes modalidades ($P \leq 0,05$) e que as fatias tratadas com quitosano foram as menos contaminadas. Assim, observa-se a seguinte ordem decrescente de contaminação: 'sem tratamentos' ($2,5 \times 10^5$ UFC/g), '0g/L' ($1,3 \times 10^5$ UFC/g), 'imerso em água' ($1,2 \times 10^5$ UFC/g), '0,7g/L' ($9,4 \times 10^4$ UFC/g), '1,5g/L' ($3,6 \times 10^4$ UFC/g), 1g/L ($1,98 \times 10^4$ UFC/g) e por fim '2g/L' ($1,6 \times 10^4$ UFC/g).

Contrariamente ao observado para microrganismos mesófilos e psicrófilos após 10 dias de conservação verificou-se um menor desenvolvimento de UFC/g nas fatias não acondicionadas em ATM, comparando com as suas homólogas acondicionadas em ATM. Estes resultados podem dever-se a uma menor susceptibilidade das estirpes de fungos e leveduras presentes nas amostras aos elevados teores de CO_2 aplicados.

Comparando os resultados com os valores-guia, verifica-se que se considerarmos que todo o número de UFC/g de cada modalidade corresponde a fungos, este é considerado 'não satisfatório' por ser superior a 10^3 . Caso se considere que todo o número corresponde a leveduras, nas modalidades 'sem tratamentos', 'imerso em água' e 0g/L também é considerado 'não satisfatório', neste caso por serem superiores a 10^5 . As restantes modalidades seriam consideradas 'aceitáveis', por estarem entre 10^2 e 10^5 .

Tal como previsto, o maior desenvolvimento de fungos e leveduras ocorreu no 16º dia de conservação, em todas as modalidades, uma vez que houve mais tempo para o desenvolvimento destes microrganismos. Neste caso não se verificaram diferenças significativas entre as modalidades, no entanto as menos contaminadas foram a '0,7g/L' ($1,2 \times 10^5$ UFC/g) e a '1,5g/L' ($1,1 \times 10^5$ UFC/g).

Ao fim de 16 dias verifica-se que o número de UFC/g de fungos e leveduras formados, é demasiado elevado, sendo considerado por comparação com os valores-guia 'não satisfatório', dado que em todos os casos o seu número foi superior a 10^5 .

Em geral, pode concluir-se que, no que respeita a fungos e leveduras, o quitosano, nas condições e na gama de concentrações testada, tem acção antifúngica mas, não é suficiente para estender o período de conservação da pêra fatiada.

3.10. Análise sensorial

A análise aos resultados estatísticos quanto ao parâmetro sensorial 'aspecto/cor', permite verificar que, a pêra ao natural tem um aspecto/cor significativamente superior ao deste fruto com ácido ascórbico acondicionado em ATM ($P \leq 0,05$), de acordo com a escala do 'nível de aceitação do produto' (Figura 3.28).

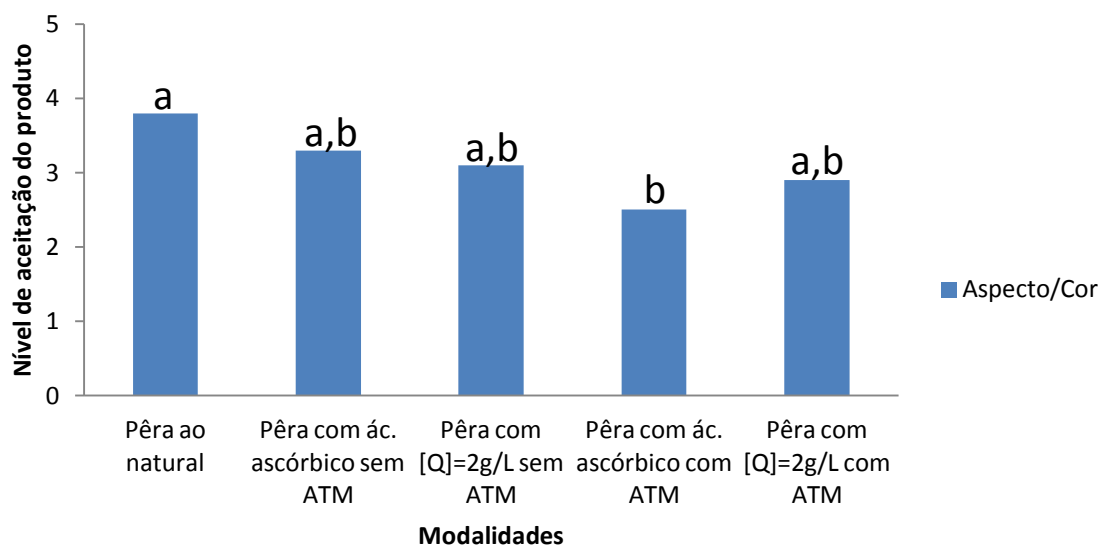


Figura 3.288 – Resultados da apreciação do aspecto/cor de fatias de pêra 'Rocha' com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).

Dado que esta modalidade reúne duas formas antioxidantes, o ácido ascórbico e a atmosfera modificada, esperava-se que os provadores tivessem uma opinião mais favorável quando comparando com a pêra ao natural porque, teoricamente, esta modalidade deveria apresentar-se menos oxidada e, portanto, deveria ser das mais apreciadas. As restantes modalidades não apresentam diferenças significativas da pêra ao natural ($P \leq 0,05$).

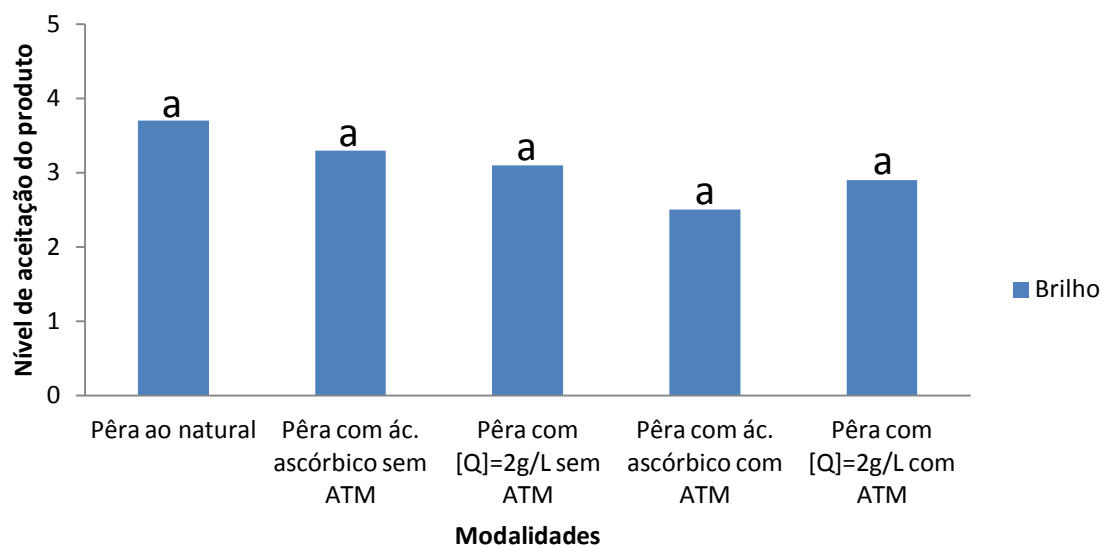


Figura 3.29 – Resultados da apreciação do brilho de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).

Para a variável ‘brilho’ (Figura3.29), constata-se que não existem diferenças significativas entre as diversas amostras analisadas ($P \leq 0,05$), o que indica que possivelmente este parâmetro não é influenciado pelos tratamentos efectuados. Analisando a figura, verifica-se que o painel é, de uma forma geral, indiferente ao ‘brilho’, ou seja, escolheram maioritariamente a opção ‘não gosto nem desgosto’ em todas as modalidades, incluindo a da ‘pêra ao natural’.

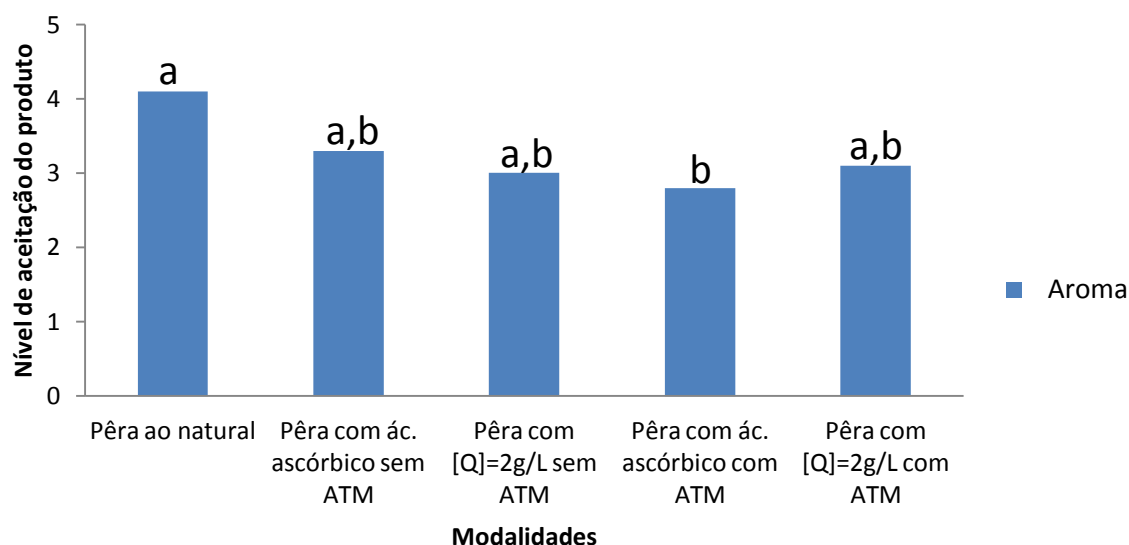


Figura 3.290 – Resultados da apreciação do aroma de fatias de pêra ‘Rocha’ com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).

Relativamente à variável 'aroma' (Figura3.30), é possível observar que a pêra ao natural é significativamente diferente da pêra com ácido ascórbico acondicionada em ATM, não apresentando diferenças significativas das restantes modalidades ($P \leq 0,05$).

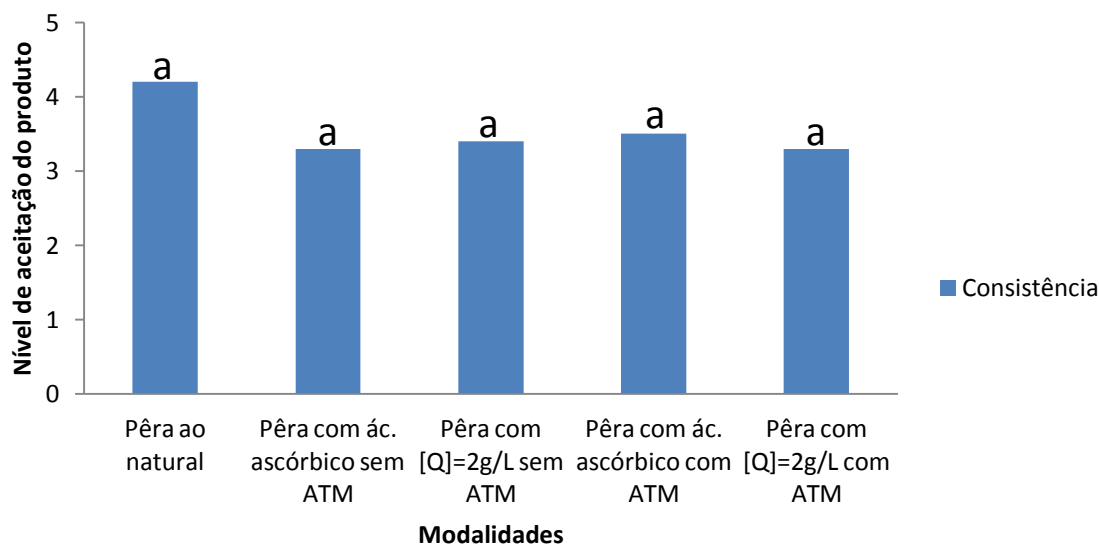


Figura 3.301 – Resultados da avaliação da consistência de fatias de pêra 'Rocha' com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).

Analisando o parâmetro 'consistência' (Figura3.31), verifica-se que não existem diferenças significativas entre as diversas modalidades analisadas ($P \leq 0,05$), o que coloca a possibilidade deste parâmetro não ser influenciado pelos tratamentos efectuados. Contudo, analisando a figura, a consistência da pêra ao natural possui um nível de aceitação ligeiramente superior.

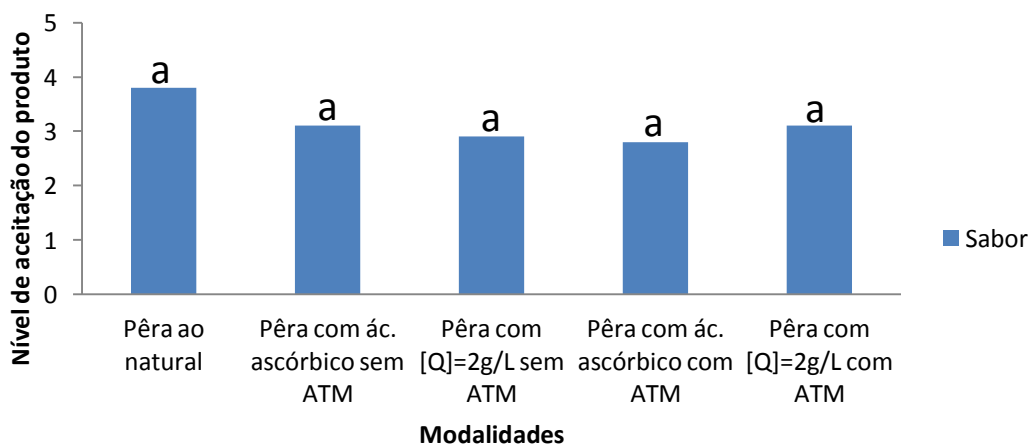


Figura 3.32 – Resultados da apreciação do sabor de fatias de pêra 'Rocha' com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 - Gostei; 5 – Gostei muito).

O sabor das fatias de pêra 'Rocha' não apresenta diferenças significativas nas diferentes modalidades analisadas ($P \leq 0,05$), indicando que, os tratamentos não têm influência neste parâmetro, o que é de extrema importância para sua potencial utilização à escala industrial (Figura 3.32).

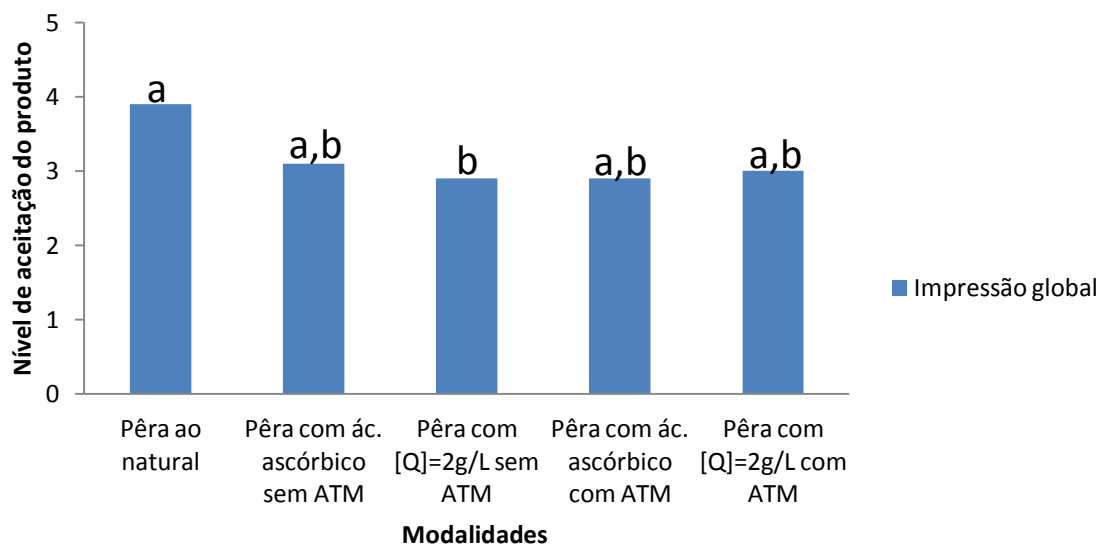


Figura 3.33 – Resultados da impressão global de fatias de pêra 'Rocha' com e sem quitosano numa concentração de 2g/L, com ácido ascórbico, acondicionadas ou não em ATM. (Legenda: 1 – Não gostei nada; 2 – Não gostei; 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei); 4 – Gostei; 5 – Gostei muito).

A 'impressão global' do painel de provadores em relação às fatias de pêra analisadas, indica que, em geral, não existem diferenças marcadas entre as modalidades. Verifica-se que a pêra ao natural só apresenta diferenças significativas da pêra com quitosano (2g/L) não acondicionada em ATM ($P \leq 0,05$). Quanto às restantes modalidades, não existem diferenças significativas (Fig 3.33).

Um dos principais objectivos da análise sensorial foi perceber se a aplicação de soluções de quitosano e de ácido ascórbico, com e sem ATM, iriam diminuir o nível de aceitação dos provadores, relativamente à pêra ao natural recentemente fatiada. Os resultados mostraram que não existem grandes diferenças relativamente à maioria das variáveis aferidas (sabor, aroma, brilho, consistência e impressão global), o que sugere que no geral, os tratamentos aplicados não afectam o perfil sensorial da pêra 'Rocha'.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Este estudo permitiu caracterizar o efeito da aplicação de diferentes concentrações do biofilme edível quitosano em fatias de pêra 'Rocha' de 4ª Gama e suas consequências nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

Quanto aos parâmetros estudados: colorimetria, humidade, SST, dureza, acidez titulável, pH, compostos fenólicos e ácido ascórbico, verifica-se quer em fatias acondicionadas em ATM quer não acondicionadas, na maior parte dos casos, não há depreciação do produto devido aos tratamentos aplicados relativamente a estes parâmetros.

Relativamente aos glícidos, em fatias não acondicionadas em ATM, os resultados permitem concluir que os tratamentos aplicados fazem diminuir ligeiramente o teor de açúcares das fatias de pêra, o mesmo não se verificando nas fatias acondicionadas em ATM.

Os resultados microbiológicos não foram conclusivos quanto à actividade antimicrobiana do quitosano, porque apenas na quantificação de mesófilos, fungos e leveduras em fatias acondicionadas em ATM durante 10 dias se verificou que as modalidades com quitosano se encontravam menos contaminadas que os controlos. Ainda assim, pode concluir-se que o quitosano possui actividade antimicrobiana e antifúngica, embora não seja suficiente para estender o tempo de conservação nos termos de segurança alimentar.

Na análise sensorial, constatou-se que, nos parâmetros: brilho, aroma, consistência, sabor e impressão global, o painel de provadores não identificou grandes diferenças entre as diversas amostras analisadas. Apenas no parâmetro 'aspecto/cor' é verificada uma influencia dos tratamentos efectuados nas fatias de pêra. Assim, concluir-se que os tratamentos aplicados não possuem um efeito depreciativo no perfil sensorial da pêra 'Rocha'.

De uma forma geral, os pontos fortes deste estudo centraram-se no facto do quitosano ser uma substância natural, edível, com capacidade para formar biofilmes e, que por ser GRAS, poderá ser aplicada a frutos minimamente processados como a pêra 'Rocha'.

Com este estudo conclui-se que a aplicação do quitosano não tem uma acção significativa na extensão do tempo de vida útil de pêra 'Rocha' de 4ª Gama. Desta forma, torna-se necessário desenvolver mais estudos relativamente à aplicabilidade deste biofilme, em que produtos e em que condições (pH, temperatura, entre outros), complementado ou não com acondicionamento em atmosfera modificada, para aferir das vantagens ao nível da conservação, referida na literatura, e na preservação da qualidade do produto.

De facto, neste estudo conclui-se ainda ser importante continuar as pesquisas relativamente à aplicação deste biofilme noutros frutos e produtos hortícolas, quer de 4ª Gama, quer inteiros, bem como avaliar as suas consequências nas características sensoriais, microbiológicas, nutricionais e físico-químicas. Deve ser também estudado o efeito da aplicação de soluções de quitosano de



diferentes concentrações, com diferentes pHs. Neste estudo, o quitosano foi dissolvido em ácido ascórbico mas poderia ter sido dissolvido noutro tipo de ácidos, pelo que, esta vertente podia ser também mais investigada.

5. Bibliografia

Ahvenianen R., "New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables", Trends Food Sci. Tech., v.7, p. 179-187, 1996.

Almeida, D., "Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas", Sociedade Portuguesa de Inovação, Porto, 2005.

Almeida, D., Pintado, M., "Caracterização Nutricional e Funcional de Variedades de Maçã de Alcobaça", Universidade Católica Portuguesa, Porto, 2007.

Andrade, P. B.; Carvalho, A. R. F.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A., "Previous Study of Phenolic Profiles of Quince, Pear, and Apple Purees by HPLC Diode Array Detection for the Evaluation of Quince Puree Genuineness", J. Agric. Food Chem., v. 46, p. 968-972, 1998.

ANP – Associação Nacional de Produtores de Pêra 'Rocha', 2011.

Antonino N. A., "Optimização do processo de obtenção de quitina e quitosano de exosqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana", Universidade Federal de Paraíba, Brasil, 2007.

AOAC, Official methods of the association of official analytical chemists (AOAC), "Analytical Methods", Washington DC, 1990.

Aquino, C., "Controlo de qualidade em frutas e hortaliças minimamente processadas", Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Araújo J. M. A., "Química de Alimentos: Teoria e prática", 2ª edição, Viçosa (Brasil), UFV, capítulo 14, 1999.

Assis O. B. G.; Leoni A. M., "Filmes comestíveis de quitosano: Acção biofúngica sobre frutos fatiados", Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, v.30, p. 33-38, 2003.

Atlas, R.M., "Handbook of Microbiological Media", Ed. Parks LC, CRC Press, Boca Raton, EUA, 1993.

Bai R. K.; Huang M. Y.; Jiang Y. Y., "Selective permeabilities of chitosan –acetic acid complex membrane and chitosan-polymer complex membranes for oxygen and carbon dioxide", Polym Bull, v.20, p. 83-88, 1988.

Baños, S., Lauzard, A.N., Velázquez-Del-Valle, M.G., López, M., Ait Barka, E., Molina, E., Wilson, C.L., "Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities", Crop Protection, v.25, p. 108, 2006.

Barberan, Tomás; Espín, J. C., "Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables", J. Sci. Food Agric., v. 81, p. 853-876, 2001.

Barth, M.M.; Zhuang, H.; Saltveit, M.E., "Fresh-cut Vegetables, in_ The commercial storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks", USDA Handbook nº 66, 2004.

Bible, B. B.; Singha, "S. Canopy position influences CIELAB coordinates of peach color", Hort Sci., v. 28, n. 10, p. 992-993, 1993.

Borderías A. J.; Sánchez I.; Pérez M., "New application of fibers in foods: addition to fishery products", Trends in Food Sci. and Tech., v.16, p. 458-465, 2005.

Borgognoni, F. C.; Polakiewicz, B.; Pitombo, R.N.M., "Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada", Ciências e Tecnologia de Alimentos, v.26, p. 502-506, 2006.

Brecht, J., "Physiology of lightly processed fruits and vegetables", Hort Sci., v.30, p. 18-22, 1995.



Campana P.; Signini R., “*Efeito dos aditivos na desacetilação da quitina*”, Ciência e Tecnologia, São Carlos, v.11, n.4, p. 169–173, 2001.

Chesnutt B. M.; Yuan Y.; Brahmandam N.; Yang Y.; Ong L.; Haggard O.; Bumgardner D., “*Characterization of biomimetic calcium phosphate on phosphorylated chitosan films*”, J. Biomed. Materials Research Part A, v.82-A, p. 343–353, 2007.

Kariman, M.E.S., “*Gamma radiation-induced crosslinked PVA/ chitosan blends for wound dressing*”, Macromol. Sci., v.44, n.5, p. 541-545, 2007.

Campotec, Consultoria de Hortofrutícolas S.A., 2011.

Casariego A.; Souza S.; Vicente A.; Teixeira J.; Cruz L.; Diaz R., “*Chitosan coating surface and permeation properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentration-application to vegetables*”, International Symposium, Food and Agric. Prod.: Processing and Innovations, p. 1–16, 2007.

Caro Y.; Joas J., “*Postharvest control of litchi pericarp browning (cv. Kwai Mi) by combined treatments of chitosan and organic acids II. Effect of the initial water content of pericarp.*”, Postharvest Biol Tech., v.38, p. 137-44, 2005.

Coma V.; Martial Gros A.; Garreau S.; Copinet A.; Salin F., Deschamps A, “*Edible antimicrobial films based on chitosan matrix*”, J. Food Sci., v.67, n.3, p. 1162-1169, 2002.

Costa Silva H. S. R.; Santos K. S. C. R.; Ferreira E., “*Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços*”, Quim. Nova, v.29, n.4, p. 776-785, 2006.

Craveiro A. A.; Craveiro A. C.; Queiroz D.C., “*Quitosana: A fibra do futuro*”, Fortaleza (Brasil), PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, capítulo 3, 1999.

Cruz J.; Kawasaki M.; Gorski W., “*Electrode coatings based on chitosan scaffolds*”, Anal. Chem, v.72, p. 680–686, 2000.

Despacho nº 13021/99 2ª Série, nº 158 de 9 de Julho de 1999.

Devlieghere F.; Vermeiren L.; Debevere J., “*New preservation technologies: possibilities and limitations*”, Int. Dairy J., v.14, p. 273, 2004.

Díaz E. D. A.; Velasco M. C. V.; Pérez F. R.; López C. A. R.; Ibarreta L. L., “*Viabilidad de bacterias lácticas en películas de quitosano para su aplicación en alimentos*”, Revista Iberoamericana de Polímeros, v.8, n.1, p. 20, 2007.

Du D.; Ding J.; Cai J.; Zhang A., “*Colloids Surfaces B: Biointerfaces*”, v.58, p. 145, 2007.

Durango A. M.; Soares N. F. F.; Andrade N. J., “*Microbiological evaluation of na edible antimicrobial coating on minimally processed carrots*”, Food Control, v.17, p. 336-41, 2006.

El Gaouth A.; Ponnampalam R.; Castaigne F.; Arul J., “*Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes*”, Hort Sci., v.27, n.9; p. 1016-8, 1992.

Empis, J.; Martins, M., “*Produtos hortofrutícolas frescos ou minimamente processados*”, Sociedade Portuguesa de Inovação, Porto, 2000.

Esteves, Eduardo, “*Notas sobre a selecção e treino de um painel de provadores para análise sensorial de produtos alimentares*”, Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Algarve, 2006. Disponível em <http://w3.ualg.pt/~eesteves>, consultado a 6 de Abril de 2011.

FAO, Roma, 2007. Acedido em www.fao.org, consultado a 10 de Abril de 2011.



FDA/CFSAN – Food And Drug Administration / Center For Food Safety And Applied Nutrition, “*Draft Guidance: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables*”, 2007. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodgui3.html>, acessado a 6 de Junho de 2011.

Fellows PJ, “*Tecnologia do Processamento de Alimentos - Princípios e Práticas*”, 2ª edição, Porto Alegre (Brasil), Artmed, p.19-22, 2006.

Feofilova E. P., “*Chronicle of the eight international conference – Moderne perspectives in chitin and chitosan studies*”, Applied Biochem. Microb., v.43, n.4, p. 473, 2007.

Fonseca, Susana. “*Development of perforation mediated modified atmosphere packaging for extending the shelf life of shredded galega kale*”, Universidade Católica Portuguesa, 2002.

Food and Drug Administration, “*Approximate pH of food and food products*”, Department of Health and Human services, USA, 2007. Disponível em <http://www.foodscience.caes.uga.edu/extension/documents/FDAapproximatepHoffoodslac-phs.pdf>, consultado a 4 de Agosto de 2011.

Francis, G. A. e O'beirne, D., “*Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes*”, Journal of Industrial Microb. Biotech., v.27, p. 111-116, 2001.

Gil, M. H.; Ferreira, P., “*Polissacarídeos como biomateriais*”. In: Química, 100, p.72-74, Google earth, 2006.

Guilbert, S.; Gontard, N.; Gorris, L. G. M., “*Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings*”, Food Sci. Tech., Amsterdam, v. 29, n.1, p.10-17, 1995.

Hamilton V.; Yuan Y.; Rigney D.A.; Chesnutt B.M.; Puckett A.D.; Ong J.L.; Yang Y.; Haggard W.O.; Elder S.H.; Kim S. K.; Rajapakse N., “*Bone cell attachment and growth on well-characterized chitosan films*”, Polymer International, v.56, p. 641, 2007.

Helander, I.M.; Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S., “*Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria*”, International J. Food Microb., v.71, p.235-244, 2001.

Herrero, A.; Guardia, J., “*Conservación de frutos – Manual técnico*”, Edição Mundiprensa, 1992.

Hojo, E. T. D., “*Qualidade de mangas ‘Palmer’ tratadas com 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração*”, UFLA, p.127, 2005.

Hudina M., Stampar F., “*Sugars and organic acids contents of European (Pyrus communis L.) and Asian (Pyrus serotina Rehd.) pear cultivars*”, Acta Aliment, v.29, p.217–230, 2000.

IAL, “*Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos*” – capítulo 6, 4ª edição., 1ª Ed. Digital, 2005. Disponível em <http://pt.scribd.com/doc/11757612/Analise-Sensorial-de-Alimentos-Capitulo-6>, consultado a 2 de Agosto de 2011.

IFPA, “*Fresh-cut produce handling guidelines*”, Prod. Mark. Assoc., Newark, 1999.

International Dairy Federation, “*Dried milk:determination of titratable acidity*”, 1981.

INSA, “*Tabela de Composição dos Alimentos*”, Centro de Segurança Alimentar e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Ministério da Saúde, Lisboa, 2007.

Instituto Nacional de Estatística, INE, 2006.

Jacxsens, L.; Devlieghere, F.; De Rudder; T.E. Debervere, J., “*Designing equilibrium modified atmosphere packages for fresh-cut vegetables subjected to changes in temperature*”, Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie- Food Sci. Tech., v.33, n.3, p. 178-187, 2000.



- Joas J.; Caro Y.; Ducamp M. N.; Reynes M., "Postharvest control of pericarp browning of litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn cv Kwai Mi) by treatment with chitosan and organic acids I - Effect of pH and pericarp dehydration", *Postharvest Biol Tech.*, v.38, p. 128-36, 2005.
- Kappel, F.; Fisher, F.R.; Hogue, E.J., "Ideal pear sensory attributes and fruit characteristics", *Hort Sci.*, Alexandria, v.30, n.5, p.988-993, 1995.
- Kader, A.A.; Sommer, N.F.; Arpaia, M.L., "Postharvest handling systems: tropical fruits". In: A.A.Kader (ed), *Postharvest Tech. Hort. Crops*, third edition. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311, p. 385-398, 2002.
- Kader, A.A.; Zagory, D.; Kerbel, E.L., "Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables", *Critical Reviews in Food Sci. Nutritin*, Boca Raton, v.28, n.1. p. 1-30, 1989.
- Kester J.; Fennema, O., "Edible Films and Coatings: A review", *Food Tech.*, v.40, n.12, p. 47-59, 1986.
- Kim S.; Rajapakse N., "Enzimatic prodution and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review", *Carbohydr. Polym.*, v.62, p. 357-368, 2005.
- Kittur, F.; Saroja, N.; Habibunnis, A.; Tharanathan, R., "Polysaccharide-based Composite Coating Formulations for Shelf-life Extension of Fresh Banana and Mango", *Europ. Food Res. Tech.*, v.213, p.306-311, 2001.
- Kittur, F.; Tharanathan, R., "Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potencial", *Food Sci. Nutrition*, v.43 n.1, p.61-87, 2003.
- Klein B.P., "Nutricional consequences of minimal processing of fruits and vegetables", *J. Food Qual.* Westport, v. 10, n. 3, p. 179-193, 1987.
- Knauer, H., "Smartline RI Detector Manua", Germany, 2007.
- Kristbergsson, K.; Einarsson, M.; Hauksoon, S.; Gislasoon, J.; Peter G., "Recent developments in deacetylation of chitin and possible applications in food formulations", University of Iceland and The Icelandic fisheries laboratories, 2007.
- Labuza, T.; Breene, W., "Application of Active Packing for Improvement of Shelf Life and Nutritional Availability of Fresh and Extended Shelf Life in Foods", *J. Food Processing Preservation*, v.13, p.1-69, 1989.
- Laurila, E. e Ahvenainen, R., "Minimal processing in practice. Fresh fruits and vegetables". In Ohlsson, T. e Bengtsson, N. "Minimal processing Technologies in the food industry". CRC Press, Boca Raton/London/New York/Washington, DC. P. 219– 224, 2002.
- Li Y.; Chen X. G.; Liu N.; Liu C. S.; Liu C. G.; Meng X. H.; YU L. J.; Kenedy J. F., "Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates", *Carbohydrate Polymers*, v.67, p. 227, 2007.
- Lima, LC., "Processamento mínimo de kiwi e mamão", Encontro Nacional sobre processamento de frutas e hortaliças, UFV, Viçosa, p. 95-109, 2000.
- Mathur, N. K.; Narang, C. K., "Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals", *Chem. Educ.*, v.67, p.938-942, 1990.
- McGlynn, William, "The Importance of Food pH in Commercial Canning Operations", *Horticultural Foods Scientist*, Oklahoma, 2001.



Montanez, J.; Oliveira, F.A.R.; PINELO, M.; Mahajan P.; Cunha L.M. e Manso, M.C., “*Design of Perforation-Mediated Modified Atmosphere Packaging for Shredded Carrots: Mathematical Modelling and Experimental Validation*”, A refereed paper from the Proceedings of the Florida State Horticultural Society, v.118, p. 423-428, 2005.

Moura, C., “*Quitina e quitosano produzidas a partir de resíduos de camarão e siri – Avaliação do processo em escala piloto*”, Revista de Ciências Exactas e Engenharia, Rio Grande, v.16, p. 37-45, 2006.

Muzzarelli C.; Muzzarelli R. A. A., “*Chitosans depolymerized with the aid of papain and stabilized as glycosylamines*”, J. Inorg. Biochem., v.92, p. 89, 2002.

Naczki M.; Shahidi F., “*Extraction and analysis of phenolics in food*”, J Chromatogr A, p. 95-111, 2004.

No K.; Meyers P.; Prinyawiwatukul W.; Xu Z., “*Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods - A Review*”, J. Food Sci., v.72, n.5, p. 87–100, 2007.

Niekraszewicz A.; Lebioda J.; Kucharska M.; Wesolowska E., “*Fibres Text.*”, v.15, n.1, p. 101, 2007.

Okuyama K.; Noguchi K.; Kanenari M.; Egawa T.; Osawa K.; Ogawa K., “*Structural diversity of chitosan and its complexes*”, Carb. Pol., v.41, p. 237–247, 2000.

Pais, I.; Ramos, A.; Barreiro, M.; Silva, M., “*Sugar variation in ‘Rocha’ pears and *Penicillium expansum* reduction by *Aureobasidium pullulans**”, Acta Hort., v.800, p.929-934, 2008.

Park, K.J.; Colato, A.G., “*Análises de materiais biológicos*”, 2006, que pode ser acessado em: http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf, consultado a 4 de Abril de 2011.

Peniche C.; Argüelles-Monal W.; Peniche H.; Acosta N., “*Chitosan: An attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation*”, Macromol. Bio Sci., v.3, n.10, p.511–520, 2003.

Pereda M.; Aranguren I.; Marcovich E., “*Characterization of Chitosan/Caseinate Films*”, Journal of Applied Pol. Sci., v.107, p. 1080–1090, 2008.

Phisalaphong M.; Jatupaiboon N., “*Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film*”, Carb. Pol., v.74, p. 482-88, 2008.

Pilon, Lucimeire, “*Conservação de abacaxi minimamente processado utilizando como coadjuvantes cloreto de cálcio, película comestível e radiação gama*”, Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2007.

Pimentel C.; Francki V. M.; Gollücke A. P., “*Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos*”, São Paulo, Varela, 2005.

Pinto S., “*Síntese e estudo de derivados do quitosano com potencial interesse biológico e ambiental*”, FEUP-UP, Porto, Portugal, 2005.

Porrit, S. W., “*The effect of temperature on postharvest physiology and storage life pears*”, Canadian J. Plant Sci., Ottawa, v.44, p. 568-577, 1964.

Plascencia, M.; Viniegra, G.; Olayo, R.; Ortega, M.M.; Shiral, K., “*Efecto combinado de quitosanos com diferente peso molecular y enzimas de hongos sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger**”, Macromol. Bio Sci., México, v.3, p. 582, 2003.

Prashanth H.; Kittur S.; Tharanathan N., “*Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions*”, Carb. Pol., v. 50, p. 27–33, 2002.

Prashanth K. V.; Tharanathan R. N., “*Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential*”, Trends Food Sci. Tech., v. 18, p. 117-131, 2006.

Queiroz, M. I.; Treptow, R. O., “*Análise sensorial para a avaliação da qualidade dos alimentos*”, Rio Grande: Ed. Furg, p. 268, 2006.

Quin C.; Li H.; Xiao Q.; Liu Y.; Zhu J., Du Y., “*Water solubility of chitosan and its antimicrobial activity*”, Carb. Pol., v.63, p. 367-374, 2006.

Ragaert, P.; Frank, V.; Devlieghere, F. e Debevere, J., “*Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits*”, Food Qual. Pref., v.15, n.3, p. 259-270, 2004.

Regulamento CE nº 492/2003 – Inscrição de denominações no registo das denominações de origem protegidas e das indicações geográficas protegidas.

Regulamento CEE nº 2081/92 – Protecção das indicações geográficas.

Regulamento nº 2073/ 2005 – Critérios microbiológicos aplicados a géneros alimentícios.

Rhodes J.; Roller S., “*Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods*”, Appl. Environ. Microbiol., v.66, n.1, p. 80-86, 2000.

Richmond, M.L.; Brandao, S.C.C.; Gray, J.I., Markakis, P.; Stine C.M., “*Analysis of simple sugars and sorbitol in fruit by high-performance liquid chromatography*”, J. Agric. Food Chem., v.29, p.4–7, 1981.

Rinaudo M., “*Chitin and chitosan: Properties and applications*”, Prog. Polym. v. 3, p.603–632, 2006.

Rinaudo M.; Domard A., “*Solution properties of chitosan*”, In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, editors. “*Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*”, London and New Yor, Elsevier, p. 71–86, 1989.

Roberts, G. A. F., “*Chitin Chemistry*”, The Macmillan Press, London, 1992.

Rossi J. R.; Singleton, V. L., “*Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents*”, Am. J. Enol. Vitic., v. 16, p. 144-158, 1965.

Sagoo S. K.; Board R.; Roller S., “*Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts*”, Lett. Appl. Microbiol., v.34, p. 168, 2002.

Santos, Maria Isabel; Correia, Cristina; Cunha, M. Isabel; Saraiva, Margarida; Novais, Rosário, “*Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração*”, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Centro de Segurança Alimentar e Nutrição, Lisboa e Porto.

Shahidi F.; Naczk M., “*Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*”, Lancaster, Technomic, 1995.

Smith, Ian, Naturdata, Biodiversidade Online, 2011. Pode ser acedido em <http://naturdata.com/Pyrus-communis-3544.htm>, consultado a 27 de Abril de 2011.

Smith, S. M., “*Measurement of the quality of apples – Recommendations of ECC .Working Group*”, East Malling Research Station, UK, 1986.

Soares, Jorge, “*O livro da pêra Rocha – Volume primeiro*”, Associação Nacional de Produtores de pêra ‘Rocha’, Cadaval, 2001.

Srinivasa P.; Ramesh M.; Kumar K.; Tharanathan R., “*Properties and sorption studies of chitosan – polyvinyl alcohol blend films*”, Carb. Pol., v.53, p. 431–438, 2003.

Sudarshan N. R.; Hoover D. G.; Knorr D., “*Antibacterial action of chitosan*”, Food Biotech., v.6, p. 257-72, 1992.



Talasila, P.C.; Chau, K.V. e Brecht, J.K., (1995), "*Design of Rigid Modified Atmosphere Packages for Fresh Fruits and Vegetables*", J. Food Sci., v.60, n.4, p. 758-766, 1995.

Teng, L. W.; Khor, E.; Tan, T. K.; Lim, L. Y.; Tan, S. C., "*Concurrent Production of Chitin from Shrimp Shells and Fungi*", Carb. Res., p. 305-316, 2001.

Tsai G. J.; Hwang S. P., "*In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria*", Fish. Sci., v.70, p. 675, 2004.

Tsai G. J.; Su W. H.; Chen H. C.; Pan C. L., "*Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation*", Fish. Sci., v.68, p. 170-177, 2002.

US FDA/CFSAN, "*Inventory of GRAS notices: summary of all GRAS notices*", disponível em <http://www.cfsah.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>, consultado a 20 de Abril de 2011.

Vangdal, E., "*Eating quality of pears*", Acta Agriculture Scandinavica, Norway, v.32, p. 135-139, 1982.
Porrit, S. W., "*The effect of temperature on postharvest physiology and storage life pears*", Canadian J. Plant Sci., Ottawa, v.44, p. 568-577, 1964.

Velásquez L., "*Quitina y quitosano: materials del pasado para el presente y el futuro - Avances en Química*", v.1, n.2, p. 15-21, 2006.

Vieira, Francilene; Borges, Graciele; Copetti, Cristiane; Gonzaga Luciano; Nunes, Eduardo; Fett, Roseane, "*Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars*", Archivos Latino Americanos de Nutricion, Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, v. 59, n.1, 2009.

Yadav A.V.; Bhise S. B., "*Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid*", Current Sci., v.87, n.9, p. 1176-1178, 2004.

Zhang D.; Quantick P. C., "*Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of lithi (Litchi chinensis Sonn) fruit*", Postharvest Biol Tech., v.12, p. 195-202, 1997.

Zheng L.Y.; Zhu J. F., "*Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular wights*", Carbohydrate Polymers, v.54, p. 527-530, 2003.

Zivanovic S.; Chi S.; Draughon F., "*Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils*", J. Food Sci., v.70, n.1, p. 45-51, 2005.

Zwietering, M. H.; deWit, J. C.; Cuppers, H. G. A. M. e Van 't Riet, K., "*Modelling of bacterial growth with shifts in temperature*", Appl. Env. Microb., v.60, p. 201-213, 1994.

6. Anexos

Folha de Prova

Testes de consumidor – Testes subjectivos

Nome: _____

Sexo: M ☐ F ☐ Idade: _____ Data: ____/____/____**Produto:** Pêra 'Rocha' fatiada

Procedimento: Analise as amostras pela ordem que consta na tabela. Utilize a escala abaixo para descrever o quanto gostou do produto em análise, assinalando na tabela a posição que melhor reflita a sua opinião para cada amostra relativamente a cada parâmetro.

- 1 – Não gostei nada
- 2 – Não gostei
- 3 – Indiferente (não gostei nem desgostei)
- 4 – Gostei
- 5 – Gostei muito

Código da amostra	Aspecto/Cor	Brilho	Aroma	Consistência	Sabor	Impressão global

Comentários: _____

Obrigado (a) pela sua participação.

Figura 6.1 – Folha de prova da análise sensorial.



Anexo II

AMCOR FLEXIBLES

Amcor Flexibles Neocel - Embalagens, Lda. Tel: (351) 21 831 89 00 Capital Social: 1.636.057,10 EUR
Av. Marechal Gomes Da Costa, 6 Fax: (351) 21 831 89 60 Reg. Cons. Com. De Lisboa N.º 22267
1849-013 Lisboa N.º Contribuinte: PT 500 137 650
Portugal

Ficha Técnica 00348

Produto: 35 OPP COEXT
Utilização: VEGETAIS
Estrutura: 03001

Rendimento m²/Kg (sem tintas): 31,3

Estrutura	μ	g/m ²
TINTAS	0,0	0,0
POLIPROPILENO COEXT. BIORIENTADO	35,0	31,9
VERNIZ ANTICONDENSAÇÃO	0,0	0,0

Permeabilidade		
Vapor Água	4	g/m ² /24h (38°C, 90% HR) ISO 9932-1990
Vapor Água	0,9	g/m ² /24h (23°C, 85% HR) ISO 9932-1990
Oxigénio	1100	cm ³ /m ² /24h (23°C, gás ar. húmido, gás teste seco) ASTM D 3985 - 95
Dióxido Carbono	3000	cm ³ /m ² /24h (23°C, gás teste seco) ASTM 3985 - 95

Totais (sem tintas)	35,0	31,9
Tolerância	4,2	2,6

Nota: A espessura de papéis, tintas e seus derivados não determinada

Condições Gerais de Utilização e Garantia

Material próprio para embalagem alimentar.
Evitar contaminações, choques físicos, variações térmicas importantes ou expor à luz do sol directa por longos períodos.
Condições de armazenamento: temperatura inferior a 30°C e humidade relativa inferior a 80 %.
Prazo de garantia: 6 meses.
Condições ideais de armazenamento: temperatura inferior a 10°C e humidade relativa inferior a 80 %.
Prazo de garantia: 1 ano.
A Amcor Flexibles não garante a qualidade de materiais conservados fora destas especificações.
Utilize sempre o stock mais antigo primeiro.
As bobinas para as máquinas de embalar devem ser aclimatadas no hall de embalagem antes da sua utilização.
Todos os produtos devem ser armazenados o mais tempo possível na sua embalagem original. As bobinas parcialmente utilizadas devem ser reembaladas.
Em caso de reclamação indique sempre os dados de identificação da(s) paleta(s), caixa(s) ou bobina(s).
Para outras informações, por favor contactar o nosso serviço técnico:
tel - 21 8318900;
fax - 21 8318960.

Cliente: 0333 - CAMPOTEC

Designação do Trabalho: 0033323BS03001 - FILME P/ 100G MAÇÃ FATIADA

Cores: 6

Observações:

Diâmetro Interno do Mandril (mm)	76	Largura da Bobina (mm)	270,0
Diâmetro Máximo da Bobina (mm)	300	Passo de Célula (mm)	150,0
Metros Lineares da Bobina (m)	1.779,1	Unidades por Bobina / Caixa	11.860,7
Metros Quadrados da Bobina (m ²)	480,4	Peso da Bobina (kg)	16,3

Nota: alguns destes valores, obtidos por cálculo, estão sujeitos a erros limitados, devido a factores que não podemos determinar com rigor tais como a quantidade de tinta ou a espessura de alguns papéis

Elaborado por: Ana Granado

Rúbrica:

Ana Granado

Data: 23/03/2007



Mod. 04.03

Figura 6.2 - Especificações do material da embalagem de ATM.